Aus dem Institut für Physiologische Chemie in Marburg
Direktor: Prof. Dr. P. Karlson

Beiträge zur Kenntnis der Wirkungsmechanismen der Hormone

Charakterisierung der neusynthetisierten Ribonukleinsäuren durch Acrylamid-Gel-Elektrophorese

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Michael Osang
aus Brieg

Marburg 1972

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Institut für Physiologische Chemie in Marburg
Direktor: Prof. Dr. P. Karlson

Beiträge zur Kenntnis der Wirkungsmechanismen der Hormone

Charakterisierung der neusynthetisierten Ribonukleinsäuren durch Acrylamid-Gel-Elektrophorese

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Michael Osang
aus Brieg

Marburg 1972

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

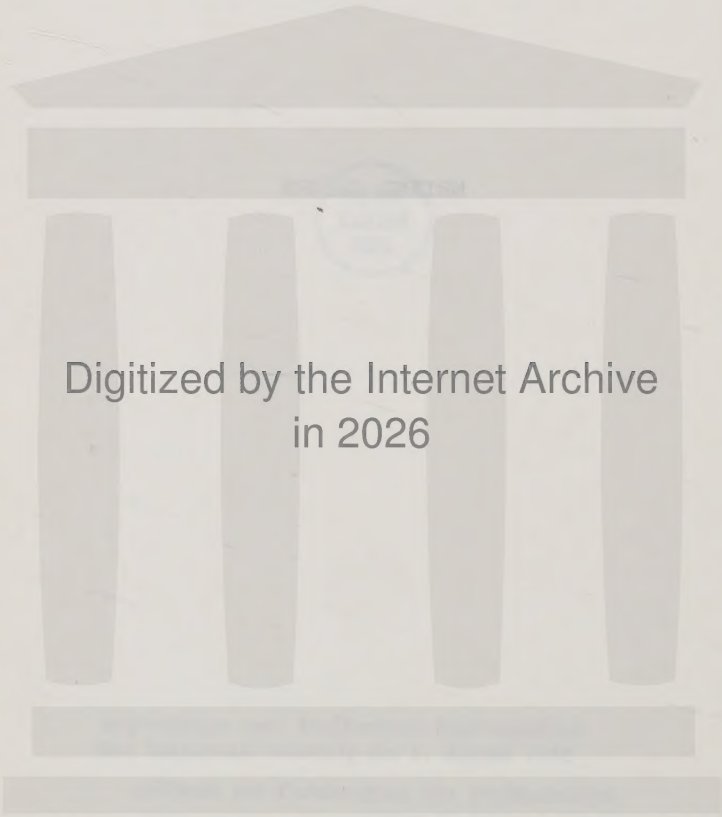
UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 1. August 1972

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen
Referent: Prof. Dr. rer. nat. P. Karlson
Correferent: Prof. Dr. med. C. Sekeris

MEINEN ELTERN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534913_0018

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Verzeichnis der Abkürzungen

1. EINLEITUNG

1.1. Wirkung der Hormone 1
1.1.1. Cortisol 2
1.1.2. Ecdyson 3
1.2. RNS im Zellstoffwechsel 5
1.3. Methoden zur Charakterisierung von RNS 7
1.3.1. Gradienten-Zentrifugation 7
1.3.2. Basenanalysen 9
1.3.3. Hybridisierung 9
1.3.4. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese 10

2. MATERIAL UND ALLGEMEINE METHODEN

2.1. Geräte 12
2.2. Material 12
2.3. Versuchstiere 12
2.3.1. Fliegenlarven 12
2.3.1.1. Schnürversuche 13
2.3.1.2. Präparation der Epidermiszellen 13
2.3.2. Ratten 14
2.3.2.1. Präparation der Leber 14
2.4. Isolierung von Zellfraktionen 14
2.4.1. Isolierung von Kernen 14
2.4.2. Isolierung von Ribosomen 15
2.5. In-vivo Markierung 16
2.6. Phenol-Extraktion der RNS 16
2.7. Charakterisierung der RNS 17
2.7.1. Saccharose-Gradienten-Zentrifugation 17
2.7.2. Acrylamid-Gel-Elektrophorese 18
2.7.2.1. Molekulargewichtsbestimmung 21
2.8. Chemische Analysen 22

3. ERGEBNISSE

3.1. Standardisierung der Methode 23
3.2. Versuche mit RNS aus Rattenleber 29
3.2.1. In-vivo Markierung und Hormonstimulierung durch Cortisol 29
3.2.2. In-vitro synthetisierte RNS 33
3.3. RNS aus der Epidermis von Calliphora erythrocephala Meig 36
3.3.1. In-vivo Hormon-Effekt 37
3.3.2. In-vivo Hormon-Stimulierung nach Schnürung 41
3.3.3. Bestimmung des Molekulargewichtes von Insekten-Dopa-Decarboxylase 46

4. DISKUSSION 47

5. ZUSAMMENFASSUNG 53

6. SCHRIFTENVERZEICHNIS 54

Lebenslauf

Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungssymbole

$A_{260\ nm}$	Absorption bei 260 nm
ATP	Adenosintriphosphat
C, uC	Curie, Mikrocurie
Cpm	Impulse pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EC	Nomenklatur der "Comission of Enzymes" (1961)
EDTA	Aethylendiamin-tetra-acetat
g	Erdbeschleunigung
GTP	Guanosintriphosphat
OD	Optische Dichte
POPOP	2,2'-p-Phenylenbis-(5-phenyloxazol)
PPO	2,5-Diphenoloxazol
RNS	Ribonukleinsäure
	mRNS Messenger-RNS
	rRNS Ribosomale RNS
	tRNS Transfer-RNS
s	Svedberg-Einheit
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U./Min.	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett

1. EINLEITUNG

1.1. Wirkung der Hormone

Zur spezifischen Wirkung von Hormonen auf Gewebe eines mehrzelligen Organismus wurden bis heute mehrere Hypothesen entwickelt, die diesen Vorgang auf einen Grundmechanismus zurückzuführen versuchen. Eingehende Übersichten finden sich z.B. in den Monographien von KARLSON und SEKERIS (63) und MUNCK (87). Erwähnt seien die bekanntesten Theorien.

Die Enzymtheorie, wonach, möglicherweise über einen "allosterischen Effekt" an Proteinen, Änderungen der Enzymaktivität verursacht werden. Ein nicht unbestrittenes Beispiel stellt das Enzym Glutamat-Dehydrogenase dar, dessen in-vitro Beeinflussung durch Steroidhormone über allosterische Beziehungen erklärt werden kann (131).

Das Adenylzyklase-System, das sich von der Beobachtung einer Aktivierung der membrangebundenen Adenylzyklase durch Adrenalin herleitet (126), fand weitere unterstützende Beispiele in ähnlichen Wirkungen von ACTH, LH, TSH und Insulin.

Die Membrantheorie, die von einer Permeabilitätsänderung der Zellmembranen ausgeht (139). KROEGER erklärt damit z.B. die Wirkung von Ecdyson an Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus thummi (68). Die durch Ecdyson verursachte Änderung der "Puff-Muster" konnte er auch durch Variationen der Natrium- und Kaliumkonzentrationen provozieren.

Die Theorie der Genaktivierung durch Hormone. Diese Hypothese wurde von KARLSON 1961 nach Experimenten mit Ecdyson an dem Riesenchromosomen von Chironomus tentans (CLEVER und KARLSON 1960 (21)) aufgestellt (57). Die Wirkung des Hormons wurde mit dem Auftreten des "Puffing-Phämomens" in Zusammenhang gebracht. Dabei kann man mikroskopisch sichtbar Verdickungen der Chromosomen sehr rasch, spezifisch bezüglich der Lokalisation sowie der Reihenfolge, und durch physiologische Konzentrationen des Hormons nachweisen. Im selben Jahr konnten BEERMANN und Mitarbeiter zeigen, daß man die Puffs als die aktiven Stellen des Genoms betrachten

kann, da dort eine gesteigerte RNS-Synthese stattfindet (10). Ebenfalls um diese Zeit wurde die bekannte Arbeit von JAKOB und MONOD veröffentlicht, in der über Enzyminduktion in Bakterien, im Zusammenhang damit zum ersten Mal über das Konzept der Messenger-RNS als Träger der in der DNS gespeicherten Information berichtet wurde (54). Nach dieser Arbeit könnten Hormone mit Repressoren in Beziehung treten. Reprimierte, inaktive Bezirke der DNS könnten so frei werden und über eine nun hier einsetzende RNS-Synthese letztlich zu einer Enzymproduktion im Zytoplasma führen. KARLSON formulierte 1961 diese Hypothese zusammenfassend (57): "Das Ecdyson und jedes andere Hormon mit ähnlichem Wirkungsmechanismus wirkt primär am Genom und führt zur Stimulierung der Messenger-RNS-Synthese, welche anschließend im Zytoplasma als Matrize für die Synthese von spezifischen Proteinen (z.B. Enzymen) dient."

Zur sinnvollen Überprüfung dieser Theorie sollte man Systeme anwenden, die weithin bekannte Beziehungen zwischen dem Auftreten eines Hormons und Veränderungen von Enzymaktivitäten bieten. Das Erfassen einer spezifischen Messenger-RNS müßte so günstige Bedingungen finden.

Übersichten über die große Zahl der heute bekannten Hormon-Enzym-Abhängigkeiten gibt z.B. TATA (128).

In dieser Arbeit werden zwei Steroid-Hormone getestet, Cortisol und Ecdyson.

1.1.1. Cortisol

Eine Hauptwirkung von Cortisol ist die Stimulierung der Synthese von Glykogen in der Leber. Diese Glukoneogenese führt über den Abbau von Aminosäuren zu Vorstufen des folgenden Aufbaus von Glukose bzw. Glykogen. Eine Übersicht darüber findet sich bei SEKERIS (111).

Analog der Hormontheorie von KARLSON kann man nach in-vivo Gaben von ^{3}H-markiertem Cortisol dieses u.a. schon 30 Minuten p.i. im Kern nachweisen (116), teils in Methanol-löslicher Form, teils an Proteine gebunden, überwiegend als physiologisch aktives Corticosteroid, Cortisol und Cortison.

Eine der ersten Wirkungen des Hormons in der Leber ist eine Stimulierung der Aktivität der DNS-abhängigen RNS-Polymerase des Kerns (Nucleoside triphosphate: RNA nucleotidyltransferase, EC 2.7.7.6), in deren Folge eine Stimulierung der RNS-Synthese (7, 74). Es werden sowohl mRNS als auch r- und tRNS vermehrt gefunden, nach SEKERIS, SCHMID und GALLWITZ selektiv mRNS (118). Darauf folgend läßt sich auch eine Stimulierung der bekannterweise von Cortisol induzierten Enzymaktivitäten zeigen (73, 113).

1.1.2. Ecdyson

Das Steroid Ecdyson ist als Häutungshormon der Insekten bekannt (56, 59). Durch Ecdyson induzierte Veränderungen an den Riesenchromosomen von Insekten waren das erste Beispiel für eine Wirkung der Hormone über die Aktivierung des Genmaterials (siehe unter 1.1. (21)). Das Hormon wurde 1954 von BUTENANDT und KARLSON kristallin isoliert (17) und von KARLSON und Mitarbeitern (61), HOPPE und Mitarbeitern (51) sowie HUBER und HOPPE (53) in der Struktur aufgeklärt.

Ecdyson stellt ein Bindeglied im neuroendokrinen System der Insekten dar. Seine Bildung in der Prothoraxdrüse wird durch ein adenotropes Hormon der neurosekretorischen Zellen des Gehirns, Ecdysiotropin, gesteuert (22).

Zusammen mit dem Neotenin oder Juvenilhormon aus den Corpora allata steuert es die wesentlichen Schritte in der beeindruckenden morphologischen und organisatorischen Umbildung der Insektenmetamorphose (Abb.1).

Bei den postembryonalen Umwandlungen von Calliphora erythrocephala ist die Hauptwirkung des Ecdysons die Puppariumbildung, die äußerlich an der Dunkelfärbung und Verhärtung der letzten Larvencuticula zu verfolgen ist (101).

Die entsprechenden biochemischen Vorgänge sind ein Einbau der aus dem Tyrosin-Stoffwechsel hervorgegangenen Sklerotierungssubstanz N-Acetyldopamin in die weiße und weiche Haut der Puppe (65) und der frischen Imago (109). Dabei werden o-Diphenole zu Chinonen oxydiert und gehen mit Cuticularproteinen eine Verbindung ein (101).

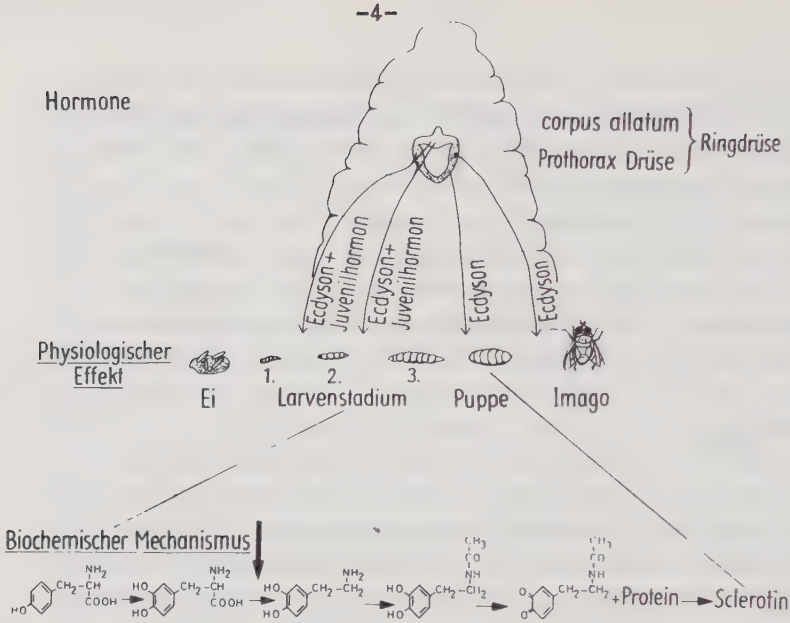


Abb. 1. Schematische Darstellung der Wirkung von Ecdyson bei Calliphora erythrocephala (nach SEKERIS (111)).

N-Acetyldopamin entsteht aus Tyrosin durch Hydroxylierung zu Dopa, nachfolgender Decarboxylierung zu Dopamin, und schließlich Acetylierung zu N-Acetyldopamin (113). Das für die Dopa-Decarboxylierung notwendige Enzym Dopa-Decarboxylase wird nach KARLSON und SEKERIS vom Ecdyson über eine de-novo Synthese induziert (62, 114, 115). Dieser de-novo Synthese unter Ecdysonwirkung geht im Epidermisgewebe, dem Bildungsort der Dopa-Decarboxylase, eine starke Zunahme des RNS-Stoffwechsels voraus. Die Stimulierung betrifft sowohl die m- als auch die r- und tRNS (111), wobei Teile der neu auftretenden RNS sicher die Information für die Synthese von Dopa-Decarboxylase tragen (60, 64, 115). Einen zwingenden zeitlichen Zusammenhang zwischen der Produktion von Ecdyson, der RNS-Synthese in der Epidermis und der Aktivität der Dopa-Decarboxylase zeigen die Veränderungen dieser drei Parameter im Laufe der Entwicklung von Calliphora erythrocephala (117, 119, 120) (Abb.1).

Es fällt die übereinstimmende Steigerung aller drei Parameter um den achten Tag der Entwicklung auf, den Beginn der Puparisierung. Hierbei spielt im Gegensatz zu den

larvalen Häutungen das Juvenilhormon keine Rolle (56).

Diese nur auszugsweise geschilderten Zusammenhänge der Metamorphose von Calliphora erythrocephala zeigen, daß der Mechanismus der Ecdysonwirkung über die Dopa-Decarboxylase ein gut geeignetes System für Arbeiten über die Wirkungsweise von Hormonen darstellt; denn zum Zeitpunkt der Verpuppung, um den 8. Tag, herrscht ein nachgewiesener und deutlicher Zusammenhang zwischen dem Wirken eines Hormons, einer Veränderung des RNS-Stoffwechsels und der Aktivität eines wohl definierten Enzyms. Es sollte unter diesen Bedingungen möglich sein, die spezifische mRNS für das Enzym Dopa-Decarboxylase zu identifizieren.

1.2. RNS im Zellstoffwechsel

Spätestens seit der Formulierung des "Zentralen Dogmas" durch CRICK 1958 (23) ist die Rolle der Ribonukleinsäuren als Bindeglied zwischen der unveränderlichen Erbinformation auf der DNS und deren vitaler Äußerung in der Proteinsynthese Allgemeingut geworden.

Das Operon als elementare Einheit der Transcription auf der DNS hat einen Promotor am Anfang und einen abschliessenden Terminator - so von JACOB und MONOD entwickelt für Bakterien (54) und von GEORGIEV erweitert für höhere Organismen (37). Diese definierten Stellen erlauben die sinnvolle Kopie einer bestimmten Stelle der DNS. Die DNS-abhängige RNS-Polymerase beginnt stets an einem Punkt, dem Promotor, und liefert eine ununterbrochene Kette des Operons bis zum Terminator.

Jedes Operon ist in zwei Abschnitte geteilt: die auf den Promotor bezogene proximale Acceptorzone und die davon distal gelegene Strukturzone. Die bei Säugetieren gegenüber Bakterien sehr ausgedehnte Acceptorzone gibt keine Information für die spätere Proteinsynthese, enthält aber Orte, die von spezifischen Proteinen wie Enzymen, Repressoren und Derepressoren etc. erkannt werden. Die Strukturzone enthält die Cistrone, welche die Informationen für die Proteinsynthese tragen, wie für Strukturproteine, Enzyme und Regulatorproteine.

Entsprechend der festgelegten Ableserichtung folgt auf der neusynthetisierten RNS-Kette zunächst ein nichtinformativer (Acceptor-), sodann der informative (Struktur-) Bezirk der Molekülkette.

Durch eine wohl auch in die RNS übertragene Information wird der nichtinformative Abschnitt noch im Kern abgebaut, in das Zytoplasma gelangt nur das informative "Reifungsprodukt" (15, 23, 26, 36, 37, 43, 55, 102, 144).

Als mRNS sollte eine zytoplasmatische DNS-ähnliche RNS nur dann bezeichnet werden, wenn sie an Ribosomen angelagert die Funktion einer Matrize zur Proteinsynthese hat. Sowohl in freier Form als auch in diesem Zustand der Anlagerung an die kleineren Untereinheiten der Ribosomen findet man die mRNS im Komplex mit sogenannten RNP-Partikeln, denen als spezifischen Proteinen wichtige Aufgaben beim Transport und der weiteren Verwendung der mRNS zukommen, dann als sogenannte mRNS-RNP-Partikel. Davon zu unterscheiden sind die im Zytoplasma freien, also nicht an Ribosomen angelagerten Komplexe, die als messenger like, also mlRNS-RNP-Partikel bezeichnet werden (37, 85, 94, 100, 122, 123, 124, 125).

Eine Reihe von Kriterien aus chemischen und physikalischen Untersuchungen geben Hinweise darauf, daß eine betreffende RNS-Spezies möglicherweise als mRNS klassifiziert werden könnte:

- -rasche Metabolisierung, z.B. meßbar durch entsprechende Kinetiken nach Markierung mit radioaktiven Vorstufen (16, 94),
- -Heterogenität der Molekulargewichte (5, 38, 86, 94),
- -Molekulargrößen, die theoretisch bei Translation zu einem Protein bekannter oder doch biologisch sinnvoller Größe führen (37),
- -Basenzusammensetzung, die ähnlich der DNS und verschieden zu der Gesamt-RNS ist (32, 45, 121, 133),
- -die Fähigkeit, sich mit homologer DNS zu einem Hybridkomplex zu vereinigen (122).

Der eigentliche, schlüssige Beweis für Messenger-Eigenschaften einer RNS ist nur durch den Nachweis der Translation in entsprechenden Protein-synthetisierenden Systemen

durch die Überprüfung des Produktes möglich.

Besondere Bedingungen erleichtern unter Umständen die Beobachtung speziell von mRNS. So wurde entdeckt, daß die Infektion mit bestimmten Viren bei Säugetierzellen oder mit Bakteriophagen bei Bakterien in den betroffenen Zellen zur fast ausschließlichen Synthese von mRNS führt (11, 32, 45, 121, 132, 140). Auch stellte sich heraus, daß die Behandlung mit Actinomycin D in geeigneter Konzentration zur selektiven Hemmung der Synthese von rRNS und tRNS führt (5, 125, 134), möglicherweise über selektive Hemmung einer der verschiedenen beschriebenen DNS-abhängigen RNS-Polymerasen (75, 82, 97).

Erleichtert werden die Untersuchungen über eine mRNS auch durch ein System, bei dem relativ überschaubare Beziehungen zwischen Gen-Aktivierung und Protein-Produkt bestehen, wenn also z.B. nur wenige oder nur ein Protein gebildet werden. Dies bietet sich z.B. an bei Zellen, die aufgrund ihres Entwicklungszyklus oder ihrer Spezialisierung eine bestimmte Proteinsyntheseleistung in den Vordergrund stellen. Bekannt unter vielen Beispielen sind Retikulozyten und Erythroblasten, bei denen die Synthese von Hämoglobin eine überragende Rolle spielt (5, 49, 70, 105).

Ähnliche Bedingungen könnten bei den umwälzenden Veränderungen in der Insektenmetamorphose herrschen, wenn durch Hormoninduktion zum Teil gut bekannte Enzymaktivitäten zeitweise stark betont sind.

1.3. Methoden zur Charakterisierung von RNS

1.3.1. Gradienten-Zentrifugation

Als routinemäßige Methode zur Charakterisierung von Makromolekülen hat sich die Bestimmung des Sedimentationsverhaltens in künstlichen Dichtegradienten, z.B. durch unterschiedlich konzentrierte Saccharoselösungen bewährt. Eine der ersten systematischen Arbeiten darüber stammt wohl von BRAKKE 1953 (14).

Bei diesem Verfahren schichtet man die Probe auf einen

zuvor hergestellten Gradienten. Reproduzierbare Verhältnisse liefert z.B ein nach BOCK und LING (13) hergestelltes Mischgerät. Während der Zentrifugation, zweckmäßigerweise in horizontal ausschwingenden Bechern, wandern die aufgeschichteten Moleküle in die kontinuierlich (auch stufenweise) zum Boden hin konzentriertere Lösung. Sie erfahren dabei durch die Zentrifugalkraft eine gleichgerichtete Beschleunigung. Entsprechend ihrer Größe und Konfiguration wandern die Teilchen jedoch gegen einen unterschiedlichen und zunehmenden Widerstand, resultierend mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Stoppt man den Vorgang, bevor alle Teilchen den Boden erreicht haben, erhält man bei kontinuierlichem Auspressen oder Austropfen des Gradienten ein zonales Profil des aufgetragenen Gemisches. Dies registriert man meist durch die Messung der Ultra-Violett-Absorption oder eventuell durch Messung der Radioaktivität.

Unter bekannten Bedingungen der Dichte und Steilheit des Gradienten sowie Dauer und Geschwindigkeit der Zentrifugation ist eine Umrechnung auf einen vergleichbaren Parameter möglich. Man benutzt dazu üblicherweise die sogenannte Svedberg-Einheit (s-Einheit) (81).

Für präparative Zwecke ist diese Methode relativ einfach und vorteilhaft. Analytischen Fragestellungen zeigt sich die erreichbare Trennschärfe jedoch oft nicht gewachsen. Eine Schwierigkeit stellt auch die oft lange Dauer der Prozedur dar. Sicher spielen ungewollte Aktivitäten von z.B. abbauenden Enzymen eine Rolle. So konnte in der industriell hergestellten Saccharose eine große Ribonuklease-Aktivität (Polyribonucleotide-2-oligonucleotide transferase, EC 2.7.7.16) festgestellt werden. Man arbeitet bei entsprechender Fragestellung daher mit Zusätzen von Enzym-Inhibitoren, um eine Degradation und so Verfälschung der Ergebnisse zu vermindern.

Eine Weiterentwicklung dieser Technik stellt die Dichte-Gradientenzentrifugation in gesättigten Cäsiumsalz-Lösungen (z.B. CsCl) dar. Während der Zentrifugation stellt sich ein Sedimentationsgleichgewicht ein, das die Ausbildung eines Dichtegradienten zur Folge hat. Makromoleküle in der Lösung sammeln sich in dem Bereich des Gradienten, der ihrer

eigenen Dichte in Lösung entspricht. Aufgrund besonderer Verhältnisse dieses physikalischen Vorgangs kann man aus der Zonenbreite, in der sich die Moleküle sammeln, mittels Ultra-Violett-Messung in der analytischen Ultrazentrifuge direkte Daten zur Bestimmung der Molekülgewichtsgröße erhalten (48, 85). Die Trennschärfe dieser Technik erlaubt die Differenzierung minimalster Dichteunterschiede der interessierenden Molekülgruppen (28).

1.3.2. Basenanalysen

Ein charakteristisches Kriterium für eine RNS-Spezies bilden die molaren Verhältnisse der typischen Basen (Adenin = A, Guanin = G, Cytosin = C, Uracil = U). Ausgehend von den für die Gesamt-DNS konstanten Basenverhältnissen Adenin:Thymidin = 1:1 und Guanin:Cytosin = 1:1 kann man z.B. eine RNS durch ihren AU:GC-Quotienten in der DNS-Ähnlichkeit klassifizieren und verschiedene RNS-Spezies vergleichen. So läßt sich feststellen, daß r- und tRNS relativ reich an GC sind, mRNS weniger GC und mehr U enthält (5, 24).

Man führt dazu eine Hydrolyse der radioaktiv markierten RNS durch. Nach chromatographischer Trennung (72) bestimmt man die Anteile der einzelnen Hydrolyseprodukte durch Messung der Radioaktivität. Natürlich sind keine Aussagen über die ursprüngliche Molekulargröße oder Sequenz der Basen möglich, jedoch oftmals die Differenzierung von physikalisch gleich erscheinenden RNS-Spezies.

1.3.3. Hybridisierung

Eine gute Aussage über die DNS-Ähnlichkeit einer RNS erlauben die Ergebnisse von Hybridisierungsversuchen. Das Prinzip geht zurück auf die Beobachtung von DNS/RNS-Komplexen bei T_2 Phagen durch HALL und SPIEGELMANN 1961 (47). Wichtig war auch die Entdeckung von DOTY, MARMUR und Mitarbeitern 1960 (28), daß eine DNS-Doppelhelix bei Erwärmung in ihre Einzelstränge zerlegt wird. Bei langsamem Abkühlen ist eine spezifische Renaturierung möglich, auch eine Hybrid-Bildung

mit RNS-Strängen. Eine solcherart angelagerte RNS läßt sich z.B. nach vorheriger radioaktiver Markierung nachweisen und quantitieren.

Im allgemeinen bedient man sich eines Verfahrens, bei dem die DNS denaturiert an Nitrocellulose-Membranen fixiert ist. Eine entsprechende RNS wird so angelagert und festgehalten. Unspezifische Kontamination beseitigt man durch Ribonuklease-Behandlung, da die angelagerte RNS von dem Enzym nicht angegriffen werden kann (45, 47, 89, 106).

Eine Ergänzung bietet die sogenannte kompetitive Hybridisierung, bei der DNS aus Escherichia coli eine zu untersuchende RNS A sowie eine zuvor radioaktiv markierte, bekannte RNS B zur Hybridbildung angeboten bekommt. Aus der Radioaktivität der letztlich entstandenen Hybride läßt sich ein relativer Maßstab für die DNS-Ähnlichkeit der angebotenen RNS-Spezies herleiten, da diese je nach DNS-Ähnlichkeit um den Platz an der DNS konkurrieren und sich gegenseitig verdrängen (30, 41, 89).

1.3.4. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die Auftrennung von Makromolekülen durch physikalische Methoden wird durch die oft nur geringen Unterschiede erschwert. So zeigt RNS auch oft ein konstantes Masse/Ladungs-Verhältnis. Bei Verfahren wie der Säulenchromatographie etc. versucht man dies durch Multiplikation von Transportphänomenen oder kleinsten Konzentrationsunterschieden bei Phasengleichgewicht zu umgehen.

Durch die Einführung der Gel-Elektrophorese macht man sich zusätzlich zu den Unterschieden des Verhaltens im elektrischen Feld noch einen für die Problemstellung günstigen Molekularsiebeffekt zunutze. Man erreicht dadurch eine Kombination von der elektrophoretischen Beweglichkeit mit dem Konzentrierungs- und dem Molekularsiebeffekt für die Trennung.

Es werden Trägermedien Agarose oder das synthetische Polymerisationsprodukt Polyacrylamid verwendet. Letzteres zeichnet sich aus durch: "chemische Stabilität und Indifferenz, seine Transparenz, die Steuerbarkeit seiner im weiten

Bereich variablen Struktur (zur Erzeugung verschiedenster Porenweiten), fehlende Adsorption und Elektroosmose, seine Stabilität gegenüber pH- und Temperaturänderungen, seine Unlöslichkeit in den meisten Lösungsmitteln, Analysenreinheit der Ausgangsstoffe sowie die gute Reproduzierbarkeit seiner Darstellung" (83).

Die apparative Ausstattung und der Materialbedarf sind gering, die Trennungszeiten zum Teil sehr kurz. Angenehm ist der Konzentrationseffekt während der Elektrophorese, der es erlaubt, mit sehr verdünnten Lösungen der Proben zu arbeiten. So werden gerade kleine Mengen um 20 ug je Gel optimal aufgetrennt und lassen sich gut nachweisen.

Die interessanteste Eigenschaft ist aber wohl das außerordentlich hohe Auflösungsvermögen für Moleküle verschiedenster Größe, zwischen Molekulargewichten von $>10^6$ bis $<10^4$ (12, 25, 46, 77, 78, 83, 91, 92, 129). Durch geeignete Wahl der Monomerkonzentration lassen sich bestimmte Molekulargewichtsbereiche selektiv erfassen und trennen. Speziell für die Auftrennung sehr kleiner RNS-Spezies hat sich die Methode schon vielfach bewährt (25, 91, 92). Die theoretischen Grundlagen der Vorgänge bei der Elektrophorese sind kompliziert, sie können hier nicht erörtert werden, die praktische Durchführung bietet aber keine großen Schwierigkeiten und hat deshalb zu einer breiten Anwendung geführt.

In dieser Arbeit werden verschiedene RNS-Spezies untersucht. Die Charakterisierung erfolgt hauptsächlich durch Auftrennung in der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese, um die besondere Eignung dieser Technik zu erproben.

In Cortisol- und Ecdyson-abhängigen Systemen wird versucht, Effekte der Hormonstimulierung auf den RNS-Stoffwechsel zu zeigen. Insbesondere sollte die Darstellung von neu auftretenden, spezifischen mRNS nach Hormonstimulierung versucht werden.

2. MATERIAL UND ALLGEMEINE METHODEN

2.1. Geräte

Zentrifugen: Beckman L-2 und L-50, Sorvall RC 2B. Ultra-Turrax der Fa. Janke & Kunkel KG, ISCO Fraktionensammler, Nuclear-Chicago Scintillationszähler Modell Mark I, Zeiss Photometer, Gilford 2400 zur UV-Absorptionsmessung von Gelen etc., DESAGA-Mikroinjektionsspritzen.

2.2. Material

^{3}H- und ^{14}C-markierte Orotsäure, Uridin und UTP wurden von The Amersham Radiochemical Centre bezogen, nicht markierte Nucleoside von Boehringer, Mannheim. Sonstige Chemikalien stammten von SERVA, Heidelberg, Fluca AG und Merck AG. Triton X-100 war ein Geschenk der Fa. Röhm und Haas, Philadelphia, Nonidet NP 40 ein Geschenk der Deutschen Shell Chemie, Hamburg.

Cortisol und Ecdyson als synthetisches Produkt wurden von der Fa. Schering AG, Berlin, zur Verfügung gestellt.

2.3. Versuchstiere

2.3.1. Fliegenlarven

Larven von Calliphora erythrocephala Meig wurden bei einer Raumtemperatur von 21 - 22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40 - 50 % auf magerem Rindfleisch gehalten. Die Larven einer Zucht stammten jeweils aus Eiern, die innerhalb von 4 - 6 Stunden abgelegt worden und aus denen die Tiere einen Tag später geschlüpft waren. Unter diesen Bedingungen verpuppten sich die Tiere am Ende des 8.Tages (22). Das Entwicklungsstadium wurde nach diesen Daten bestimmt, wenn sich so auch eine gewisse Streuung ergab (98, 100).

2.3.1.1. Schnürversuche

Durch Abschnüren des vorderen, thorakalen Drittels der Larven erreicht man, daß das in der Prothoraxdrüse gebildete Ecdyson den hinteren Teil des Tieres nicht erreichen kann. Schnürt man kurz vor Beginn der Verpuppung, so stellt der hintere Teil ein Präparat dar, das nur durch künstliche Zufuhr von Ecdyson in die Verpuppung eintreten kann. Man hat so die Möglichkeit, an vielen Tieren gleichzeitig gesteuert eine Hormonstimulierung durchzuführen.

Der Kopfteil wurde mit einem Zwirnfaden abgeschnürt, ohne jedoch die Epidermis einzuschneiden. Er verpuppte sich innerhalb von 24 Stunden, wenn die Bedingungen der Zucht beibehalten wurden. Für die weitere Verarbeitung wurden nur Tiere verwendet, die zu etwa derselben Zeit die Verpuppung begannen und eine gleichmäßig dunkelbraune Farbe des Kopfes zeigten.

Die Applikation der Kontroll- und Testsubstanzen erfolgte nach den jeweiligen Versuchsbedingungen mittels Mikrospritzen in den larvalen Restkörper. Durch eine Markierung auf der Unterlage wurde die Reihenfolge der Behandlung für diejenige der Präparation festgehalten.

2.3.1.2. Präparation der Epidermiszellen

Der verpuppte Kopfteil wurde dicht hinter der Schnürstelle abgeschnitten. In einer Petrischale mit eiskaltem TSS-Puffer (ein 0,05 M TRIS-Puffer, pH 7,55, mit 0,25 M Saccharose, 0,025 M KCl und 0,01 M $MgCl_2$) wurde der Fettkörper mit einem Spatel ausgestrichen, die Cuticula in einer zweiten Schale mit TSS-Puffer kurz gewaschen und sofort auf Trockeneis eingefroren.

Sollten verschiedene Zellfraktionen isoliert werden, erfolgte die weitere Behandlung wie unten beschrieben (siehe unter 2.4.).

Für eine folgende Phenolextraktion aus der Gesamtcuticula wurden die Tiere wie zuvor, jedoch in Extraktionspuffer präpariert (dieser Puffer enthielt 0,14 M NaCl, 0,05 M Natriumacetat, 140 ug/ml Polyvinylsulfat, 0,1 % So-

diumdodecylsulfat und 4 mg/ml aufbereitetes Bentonit (35), pH 5,0). Dieses Material wurde in dem entsprechenden Volumen dieses Puffers (z.B. 30 Tiere in 20 ml) aufgenommen und in einem Ultra-Turrax bei 24000 U./Min. homogenisiert, ständig durch ein Eisbad gekühlt.

2.3.2. Ratten

Männliche Wistar BR II Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 120 - 160 g, unter standartisierten Bedingungen gehalten, wurden von der Fa. Brünger bezogen. Teilweise wurden auch Tiere aus der eigenen Tierzucht des Institutes verwendet.

2.3.2.1. Präparation der Leber

Die Tiere wurden durch Bruch des Halsmarkes getötet und die freigelegte Leber sofort durch die Portalvene mit 10 ml eiskaltem TSS-Puffer gespült. Bei der weiteren Präparation der Leber mußte besonders darauf geachtet werden, die Darmwände etc. nicht zu verletzen wegen der Gefahr einer Verunreinigung durch Bakterien.

2.4. Isolierung von Zellfraktionen

2.4.1. Isolierung von Kernen

Die Methode folgt den Angaben von LUKACS und SEKERIS (80).

Bei den Schritten der Zellfraktionierungen mußte besonders auf die Einhaltung der Temperaturen von 0^{o} - 2^{o}C geachtet werden.

Nach einer groben Zerkleinerung des Materials, wie Rattenleber oder Cuticula von Calliphora erythrocephala, wurde es in 5 Vol. TSS-Puffer in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert (99). Es wurde ein motorgetriebener Teflonstößel mit einer Paßgenauigkeit von 300 um verwendet, der mit einer Drehzahl von 1500 U./Min. zehnmal durch das ganze Volumen bewegt wurde.

Das Homogenat wurde durch eine einfache, darauf durch eine sechsfache Mull-Lage gefiltert, anschließend 7 Min. bei 750xg in einer Sorvall Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der erhaltene zytoplasmatische Überstand wurde zum Teil für die Isolierung weiterer Zellfraktionen benutzt oder direkt zur RNS-Extraktion phenolisiert.

Das Sediment wurde in 10 Vol. TSS-Puffer aufgenommen, erneut homogenisiert und mit einem gleichen Vol. einer 1%igen Lösung von Triton X-100 oder Nonidet NP 40 gemischt. Nach 30 Sek. wurden die Kerne bei 800xg 5 Min. zentrifugiert. Das Sediment wurde nochmals in 20 Vol. TSS-Puffer gewaschen und bei 800xg 5 Min. zentrifugiert.

Durch die Entfernung der Kerne aus ihrer zytoplasmatischen Umgebung werden Proteasen und Nukleasen aktiviert und Kernstruktur und - funktion rasch zerstört. Deshalb mußten die präparierten Kerne stets unmittelbar für Tests etc. verwendet werden.

Die Präparation von Kernsediment durch hypotonische Lysis folgte der Methode von BEATO und Mitarbeitern (8, 9).

2.4.2. Isolierung von Ribosomen

Die Methode folgt den Angaben von SEKERIS und LANG (116).

Als Ausgangsmaterial wurde der Überstand nach der ersten Zentrifugation der Kernpräparation verwendet. Zur Trennung von den Mitochondrien folgte eine Zentrifugation bei 20 000 U./Min. über 20 Minuten. Dabei erschienen die Mitochondrien im Sediment.

Der erhaltene Überstand wurde erneut zentrifugiert in einem Spinco Ti 50 Rotor bei 48 000 U./Min. über 90 Minuten (≙ 150 000xg). Es blieben so im Sediment Polysomen, freie und membrangebundene Ribosomen. Zur weiteren Reinigung von Membranbestandteilen folgte eine zweimalige Behandlung des Sedimentes mit einem Gemisch aus 9 ml TSS-Puffer und 1 ml einer 2,5 %igen Desoxycholat-Lösung (pH 8,0) in einem 0,2 M Glycylglycin-Puffer, pH 8,0. Danach wurde jeweils in einem Spinco Ti 50 Rotor bei 48 000 U./Min. über 90 Minuten zentrifugiert. In diesem Sediment erschienen die gereinigten Ribosomen

2.5. In-vivo Markierung

Die in-vivo Markierung von RNS aus Rattenleber und Epidermis von Calliphora-Larven erfolgte mit ^{3}H- oder ^{14}C-markiertem Uridin oder Orotsäure, gelöst in einem Tris-Puffer, pH 7,9. Die Kontrolltiere erhielten nur diesen Puffer gespritzt. Die Aktivität und Dauer der Markierung war entsprechend den jeweiligen Versuchsbedingungen unterschiedlich. Die Injektion erfolgte bei den Ratten intraperitoneal, bei den Fliegenlarven mit Mikrospritzen in den larvalen Restkörper. Eine teilweise notwendige Reinigung der markierten Substanzen erfolgte chromatographisch nach einer Methode von SCHILZ und SEKERIS (107).

Bei der Auswertung der zur Charakterisierung von RNS durchgeführten Dichte-Gradienten oder Elektrophoresen tauchte häufig die Frage nach der Signifikanz der Ergebnisse auf, wenn die Daten aus verschiedenen Zentrifugenröhrchen oder Gelen in Beziehung gesetzt werden sollten, z.B. Kontroll- und Hormon-Versuch. Deshalb wurden die Versuche größtenteils mit Doppelmarkierung durchgeführt. So konnten die verschiedenen Schritte der Präparation, RNS-Extraktion und Trennung in Gradienten oder Elektrophorese unter völlig identischen Bedingungen erfolgen. Die unterschiedliche Herkunft der Radioaktivität kann über die verschiedenen Energiespektren der Isotopen in der Scintillationsmessung erfaßt werden.

2.6. Phenol-Extraktion der RNS

Das geschilderte Verfahren folgt einer von SCHÜTZ und Mitarbeitern entwickelten Methode (39, 108). Das Ausgangsmaterial wurde in Extraktionspuffer aufgenommen, in TSS-suspendiertes Material wurde 1:1 mit Extraktionspuffer verdünnt. Mit dem gleichen Volumen wassergesättigten Phenols wurde das Gemisch 10 Minuten bei 65° oder 37°C (nach den entsprechenden Versuchsbedingungen) (39) kräftig geschüttelt, abschließend im Eisbad rasch abgekühlt. Die wässrige Phase wurde vom Phenol durch Zentrifugation bei 3500xg über 5 Minuten getrennt, abgehoben und erneut mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt. Diese Extraktion

wurde je nach Ausgangsmaterial und Konzentration mehrmals durchgeführt, bis die wässrige Phase klar und bläulich opaleszierend war. Die Phenolreste wurden durch mehrmaliges, kurzes Ausschütteln in eiskaltem Äther entfernt.

Die RNS wurde durch Zugabe des zweifachen Volumens Äthanol bei -40°C gefällt, ein weißes, flockiges Präzipitat konnte man erfahrungsgemäß nach 5 Stunden erhalten. Zum weiteren Gebrauch wurde das Gemisch zentrifugiert und die sedimentierte RNS im Vakuum bei 4°C getrocknet.

2.7. Charakterisierung der RNS

Als Methoden zur Charakterisierung einer RNS wurden hauptsächlich die Saccharose-Gradienten-Zentrifugation und die Acrylamid-Gel-Elektrophorese angewandt. Teilweise erfolgten Basenanalysen nach einer modifizierten Methode von LANE (72).

2.7.1. Saccharose-Gradienten-Zentrifugation

Die RNS-Proben wurden in einem Puffer mit 0,14 M NaCl, 0,05 M Natriumacetat und 0,05 % SDS, pH 5,0, aufgenommen. Lineare Saccharose-Gradienten mit demselben Puffer wurden in einem nach BOCK und LING (13) konzipierten Mischgerät hergestellt. Störend war häufig die starke Schaumbildung durch den SDS-Anteil. Die Vorbereitungen und die Zentrifugation mußten bei mindestens 15°C erfolgen, da das SDS bei tieferen Temperaturen ausfällt.

Die Fraktionen wurden in einem ISCO-Gerät gesammelt, dabei gleichzeitig die UV-Absorption bei 254 nm gemessen und auf Filterpapierplättchen getropft. Zur Messung der säureunlöslichen Radioaktivität wurden die Plättchen fünfmal in eiskalter 5 %iger Perchlorsäure gewaschen, dann fünfmal in Methanol und zweimal in Äther. Die Proben wurden in Gläschen mit 15 ml T-Fluor eingebracht (5 g PPO, 0,1 g POPOP in 1 Liter Toluol p.a.). Es wurde ein Nuklear-Chicago-Scintillationszähler, Modell Mark I, benutzt. Die Sedimentationszahlen wurden durch den Vergleich mit bekannten RNS-Arten nach MARTIN und AMES (81) bestimmt.

Tabelle 1 enthält einige typische Angaben der hier durchgeführten Saccharose-Gradienten-Zentrifugationen.

Tabelle 1

Bezeichnung	Saccharose-Gradient	Volumen (ml)	Rotor-Typ	Zeit (Std)	U./Min.
A	5-30 %	5	SW-39	12	38 000
B	5-30 %	11	SW-41	14	37 000
C	15-30 %	11	SW-41	12	20 000
D	5-20 %	5	SW-65	12	29 000
E	5-30 %	5	SW-65	3,5	60 000

Sollten einzelne Fraktionen des Gradienten weiter untersucht werden, wurde die RNS erneut in Äthanol gefällt.

2.7.2. Acrylamid-Gel-Elektrophorese

Als gut reproduzierbares System hatte sich die Methode nach LOENING (77, 78) erwiesen, die in einigen Punkten modifiziert wurde.

Das verwendete Acrylamid wurde umkristallisiert. Dazu wurden 50 g Acrylamid in 1 Liter Chloroform p.a. bei 50°C gelöst, gefiltert und neu kristallisiert. Das so erhaltene Produkt zeigte eine optische Dichte von weniger als 0,2 bei 265 nm, eignete sich also gut für eine spätere Auswertung der Gele durch Scannen der UV-Absorption.

Zur Herstellung der Gele wurden folgende Lösungen verwendet:

A	Acrylamid	30 %	als Monomer der Acrylamid-Konzentration als Ko-Monomer
	Bis-Acrylamid	1,5 %	
	in aqua bidest.		

B	Tris	36	mM	
	Natrium dihydrogen-phosphat.2 H_2O	30	mM	
	Di-Natrium-EDTA	1	mM	
	TEMED	5,5	ml	
	aqua bidest.	ad 1000	ml	
	Der pH-Wert betrug bei Raumtemperatur 7,6			
C	Ammonium-Persulfat	0,14	%	als Katalysator (täglich frisch angesetzt)

Diese Lösungen wurden nach folgender Tabelle gemischt:

Tabelle 2

Gel-Konzentration	Lösung (ml)			aqua bidest.
	A	B	C	
2,6 %	4,12	18,0	14,0	12,16
7,5 %	10,0	15,0	9,0	6,0

In diesem Verhältnis konnten auch beliebige andere Konzentrationen erreicht werden.

Das Gemisch wurde mit einer Wasserstrahlpumpe ca. 15 sek. entgast, sodann in 10 cm lange Glasröhrchen mit einer Innenweite von 0,9 cm gefüllt. Die Glasröhrchen waren dazu an einem Ende mit einer Folie verschlossen. Um eine plane Oberfläche zu erreichen, wurde die Gellösung mit Wasser überschichtet.

Die Polymerisation dauerte bei Raumtemperatur an Tageslicht zwischen 30 Minuten und 1 Stunde.

Es hatte sich als zweckmäßig erwiesen, die Glasröhrchen stets in Chromschwefelsäure zu reinigen und nach dem Spülen kurze Zeit in einem nichtjonischen Netzmittel (z.B. Photo-Flo von Kodak) einzuweichen. Man vermeidet dadurch das Auftreten von Randschlieren und Unregelmäßigkeiten in der Gel-Oberfläche.

Zur Füllung der Elektrophoresekammer (ein Shandon-Gerät) wurde die Lösung B 5x verdünnt und enthielt zusätzlich 2g/Liter SDS. Das SDS wurde ebenfalls zur Verringerung der UV-Eigenabsorption zuvor in Aceton/Wasser umkristallisiert.

Vor Auftragen der Proben erfolgte nun zunächst eine Vor-Elektrophorese mit den frischen Gelen, bei einer Stromstärke von 5 mA je Gel über 2 Stunden. Man erreicht dadurch eine weitere Reinigung der Gele von UV-absorbierenden Substanzen und anderen Verunreinigungen, die Reaktionen mit der RNS eingehen könnten (34). Gleichzeitig wandert auch das SDS in die Gele ein. Die Laufrichtung ist vom Minus- zum Plus-Pol.

Nach der Vor-Elektrophorese wurde der Kammerpuffer gewechselt, jetzt ein Tropfen einer 1 %igen Bromphenolblau-Lösung hinzugefügt. Der Farbstoff wandert mit der Pufferfront und erlaubt so eine Kontrolle der Wanderungsgeschwindigkeit.

Die Proben wurden in Lösung AB aufgenommen, die zusätzlich 0,2 % SDS und 10 % Saccharose enthielt. Der Zusatz der Saccharose sollte ein Vermischen der Proben mit dem Kammerpuffer verhindern. Es wurde je Gel höchstens 120 ug RNS aufgetragen. Bis zu dieser Menge erzielte man eine optimale Trennschärfe bei gleichzeitig ausreichender Nachweismöglichkeit. Auch wurde bei dieser RNS-Probe je Gel eine gute lineare Abhängigkeit der Wanderungsstrecke vom Logarithmus des Molekulargewichtes beobachtet (70).

Bei Beginn der Trenn-Elektrophorese wurde zunächst mit einer Stromstärke von 1,5 mA je Gel über 1 Stunde gearbeitet. Dadurch vermeidet man beim Eindringen der Substanz in das Gel und der Fokussierung, die mit einem erhöhten Widerstand im Stromkreis verbunden sind, eine zu große Deformierung des Gels durch Wärmekonvektion. Es folgte nun der eigentliche Trennvorgang bei einer Stromstärke von 6 mA je Gel über 8-12 Stunden, ersichtlich am Wandern der Farbstoffront.

Man löst die Gele aus den Glasröhrchen mit einer Kanüle, durch die als Gleitmittel ein Glycerin/Wasser-Gemisch zwischen Gel und Wand gedrückt wird.

Als Netzgerät wurde ein Fabrikat von Shandon benutzt, das eine wahlweise automatische Konstanz der Stomstärke oder der Spannung erlaubte.

Zum Färben wurden die Gele 10 Minuten in 1 N Essigsäure fixiert, darauf in eine 0,2 % Methylenblaulösung in einem 0,4 M Acetat-Puffer 1 Stunde inkubiert. Entfärbt wurde über Nacht in fließendem kalten Wasser (77).

Zum Scannen der UV-Absorption wurden die fixierten, ungefärbten Gele in einer Quarz-Küvette bei 260 nm und einer Schlitzweite von 0,05 x 2,36 mm in einem Gilford 2400 Gerät mit kontinuierlichem Vorschub gemessen.

Zur Messung der Radioaktivität wurden die fixierten Gele nach der UV-Messung erneut in die Glasröhrchen geschoben. Die Röhrchen wurden als Zylinder in eine Spritze eingeschraubt und das Gel durch kontinuierlichen Vorschub eines Gummistempels über ein Gewinde durch ein Sieb gepreßt. So konnten Fraktionen von beliebiger Schichtdicke gesammelt werden.

Die einzelnen Fraktionen wurden in Gläschen mit je 0,5 ml aqua bidest. aufgefangen und 2 Stunden geschüttelt. Die Scintillationsflüssigkeit auf Dioxan-Basis enthielt: 60 g Naphthalin, 4 g PPO, 0,2 g POPOP, 100 ml Methanol, 20 ml Äthylenglycol, 880 ml Dioxan. Je Meßgläschen wurden 10 ml eingefüllt. Gemessen wurde im Nuklear-Chicago, Mark I.

Gefärbte Gele konnten auch zur Dokumentation photographiert werden.

2.7.2.1. Molekulargewichtsbestimmung

Nach LABRIE (70) besteht bei kleinen RNS-Konzentrationen in der Acrylamid-Gel-Elektrophorese eine lineare Beziehung zwischen der Wanderungsstrecke der RNS und dem Logarithmus des Molekulargewichtes.

Auf diese Weise läßt sich das Molekulargewicht einer unbekannten RNS-Spezies im Vergleich mit bekannten Arten graphisch auf halblogarithmischem Millimeterpapier annähernd ermitteln. Die Vergleichs-RNS, die als Marker in den Elektrophoresen unter identischen Bedingungen wie die Proben behandelt wurde, wurde aus den verschiedenen Zell-

fraktionen von Rattenleber, Calliphora erythrocephala, E. coli und Bäckerhefe im Saccharose-Gradienten gewonnen. Für die bekannten Svedberg-Einheiten dieser RNS-Arten wurden Molekulargewichte wie in Tabelle 3 angenommen:

Tabelle 3

s-Einheit	Molekulargewicht
4s	25 000
5s	46 500
16s	550 000
18s	620 000
23s	1 200 000
28s	1 800 000

Die Wanderungsstrecken der interessierenden RNS-Spezies wurden auf Gelen verschiedener Konzentrationen mit den Strecken der bekannten Marker-RNS verglichen, um Artefakte möglichst auszuschließen.

2.8. Chemische Analysen

DNS-Bestimmungen wurden nach der Methode von CERIOTTI (19) durchgeführt.

Reine RNS-Lösungen wurden durch photometrische Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1,0 wurde als 30 µg RNS/ml angenommen (117).

Durch Makromoleküle wie DNS oder Proteine verunreinigte RNS-Lösungen wurden nach der Methode von OGUR und ROSEN bestimmt (907.

Die Bestimmung von Protein erfolgte nach der Methode von LOWRY und Mitarbeitern (79) mit Serumalbumin als Standard.

3. ERGEBNISSE

3.1. Standardisierung der Methode

Zur Entwicklung der Verfahren zur Charakterisierung einer RNS wurde ribosomale RNS aus Rattenleber verwendet. Als Ausgangsmaterial für die Phenolextraktion diente der zytoplasmatische Überstand aus der ersten Zentrifugation der Kernpräparation. Außer den zytoplasmatischen Bestandteilen enthielt er sicher auch Kerntrümmer.

Die Ergebnisse von Saccharose-Gradienten-Zentrifugationen zeigten stets mit nur geringen Variationen die Verteilung der Abb.2. Man erkennt deutlich drei Gipfel bei 4-7s, 18s und, häufig in den vorhergehenden teilweise übergehend, 28s bis zum Sediment aus größeren Molekulargewichtsbereichen. Dies entsprach erwartungsgemäß den ribosomalen Anteilen von 18 und 28s. In dem breiten Gipfel von 4-7s sind wohl viele verschiedene Fraktionen enthalten, die jedoch nicht isoliert in Erscheinung treten.

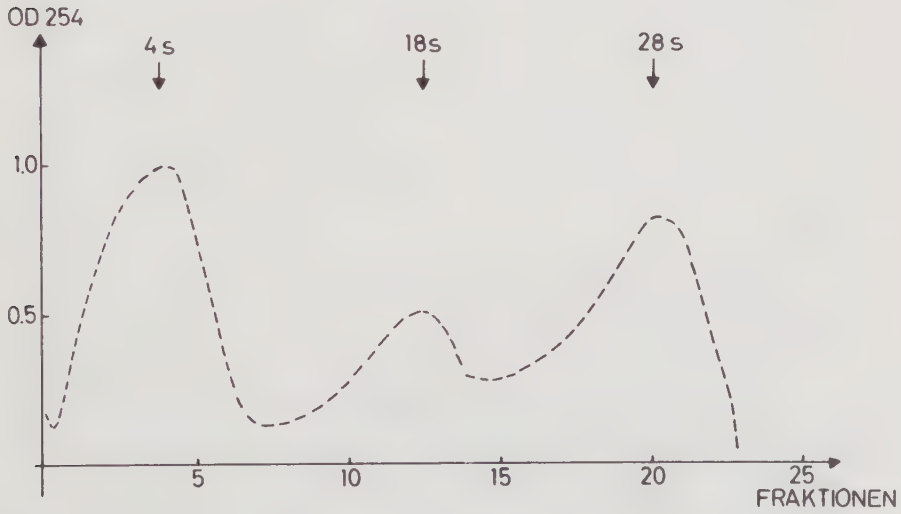


Abb. 2. UV-Profil einer im Saccharose-Gradienten aufgetrennten rRNS aus Rattenleber. Bedingungen der Zentrifugation wie "B" in 2.7.1.

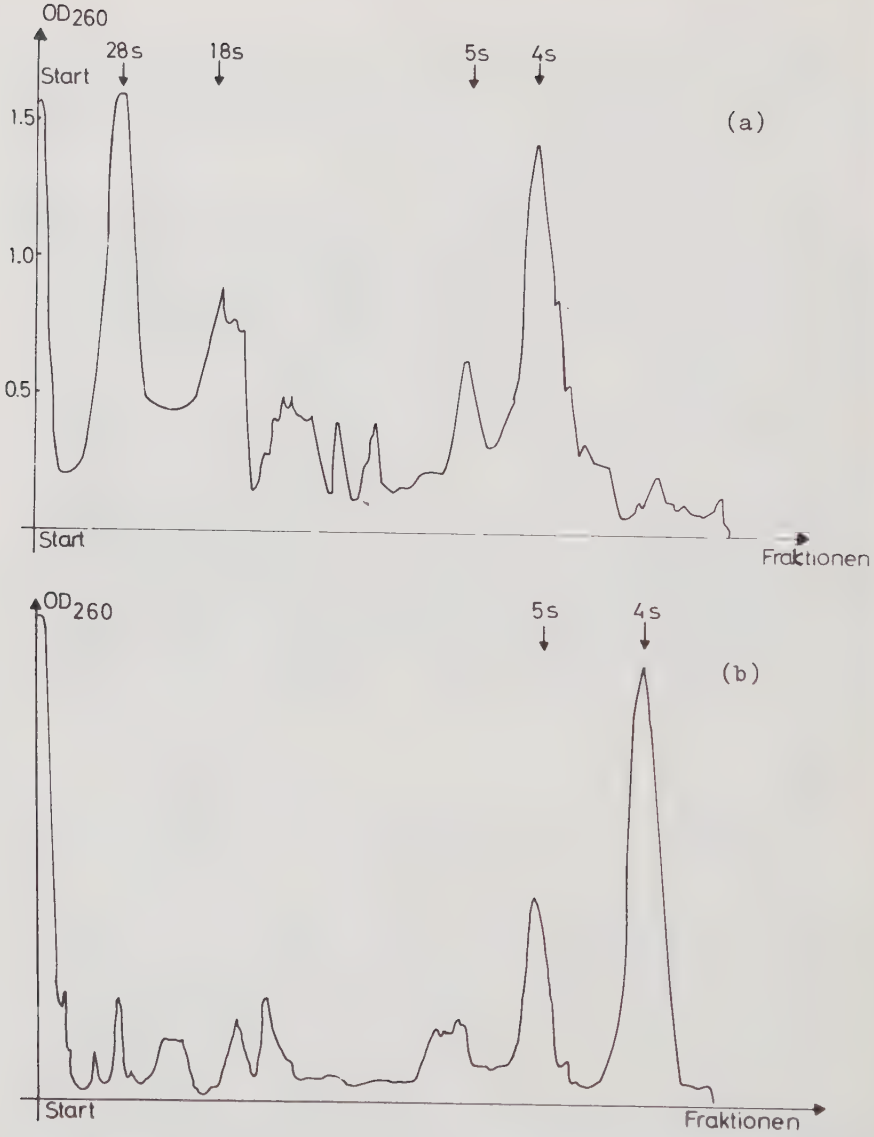


Abb. 3. UV-Profil einer in der Acrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennten rRNS aus Rattenleber.
a.) 2,6% Gel: Vorlauf 2 Stunden 5 mA/Gel. Lauf 1 Stunde 1,5 mA/Gel, 9 Stunden 6 mA/Gel.
b.) 7,5% Gel: Vorlauf wie oben. Lauf 1 Stunde 1,5 mA/Gel, 8 Stunden 6 mA/Gel.

Diesselbe RNS sollte in der Acrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt werden.

Durch verschiedene Monomer-Konzentrationen kann man die Gele an Bereiche besonders interessierender Molekulargewichtsgruppen anpassen. Mit zunehmender Konzentration wächst die Trennschärfe für die noch in das Gel wandernden Moleküle.

Durch Vorversuche hatten sich 2,6 % und 7,5 % Gele als vorteilhaft erwiesen. 2,6 % Gele erfassen den Bereich von <4s bis zum 30s-Bereich. Man erhält so einen guten Überblick über die Verteilung von t-, r- und zytoplasmatischer DNS-ähnlicher RNS. Der Nachteil ist, daß die kleineren Anteile (<10s) nur wenig aufgetrennt werden. Dies erreicht man durch 7,5 % Gele, in die nur Moleküle <18s einwandern, sodaß man bei geeigneter Gesamtlaufstrecke den Bereich von 18s bis <4s als Profil über die gesamte Länge des Gels erhält. So treten Spezies in Erscheinung, die von der Technik der Saccharose-Gradienten-Zentrifugation sicher nicht aufgetrennt werden.

Repräsentative Verteilungsmuster der o.a. RNS in der Elektrophorese auf 2,6 % und 7,5 % Gelen zeigen die Abb. 3a und b. Das 2,6 % Gel zeigt scharfe Gipfel bei 4s, 5s, mehrere Zwischengipfel zwischen 5s und 18s, bei 18s und 28s. Das 7,5 % Gel ergibt eine Auftrennung in scharfe Fraktionen bei 4s und 5s sowie eine große Zahl heterogen über den erfaßten Bereich bis 18s verteilter Spezies. Die Moleküle, die aufgrund ihrer Größe nicht mehr in das Gel eindringen konnten, bleiben als ein Gipfel an der Startzone des Gels.

Es bot sich an, eine Kombination in einem Gel mit verschiedenen Konzentrationsstufen zu versuchen (46, 91). Sie wurden so hergestellt, daß die Moleküle zunächst durch das 2,6 % Gel in ein anpolymerisiertes 7,5 % Gel wanderten. Abb. 4 zeigt das Photo eines mit Methylenblau gefärbten Geles, auf dem die auch zuvor verwendete RNS aufgetrennt wurde. Die Vorteile der verschiedenen Konzentrationen scheinen in einem Gel vereinigt. Es stellte sich aber heraus, daß sich in der Übergangszone der Gelabschnitte eine Bande ansammelte, die aus präzipitierten Anteilen und aus Mole-

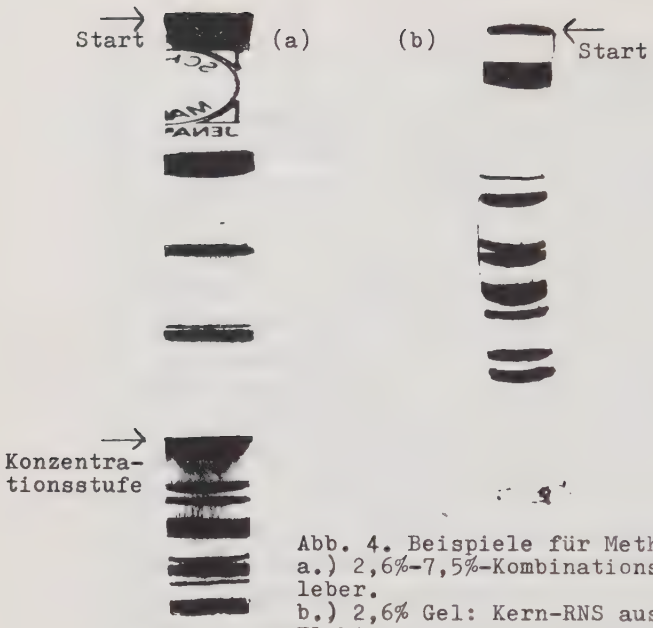


Abb. 4. Beispiele für Methylenblau-gefärbte Gele.
a.) 2,6%-7,5%-Kombinations-Gel: rRNS aus Rattenleber.
b.) 2,6% Gel: Kern-RNS aus Rattenleber.
Elektrophoresebedingungen für beide Beispiele wie in Abb. 3a. (Banden nachgezeichnet)

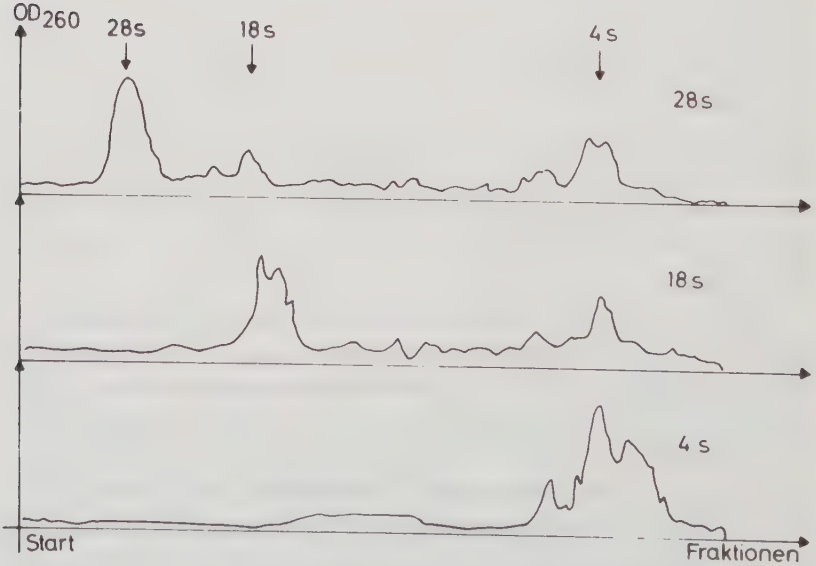


Abb. 5. UV-Profile der aus Saccharose-Gradienten gesammelten 28s-, 18s- und 4s-Fraktionen von rRNS aus Rattenleber nach folgender getrennter Acrylamid-Gel-Elektrophorese auf 2,6% Gelen. Bedingungen der Saccharose-Gradienten-Zentrifugation wie "C" in 2.7.1. Bedingungen der Elektrophorese wie in Abb. 3a.

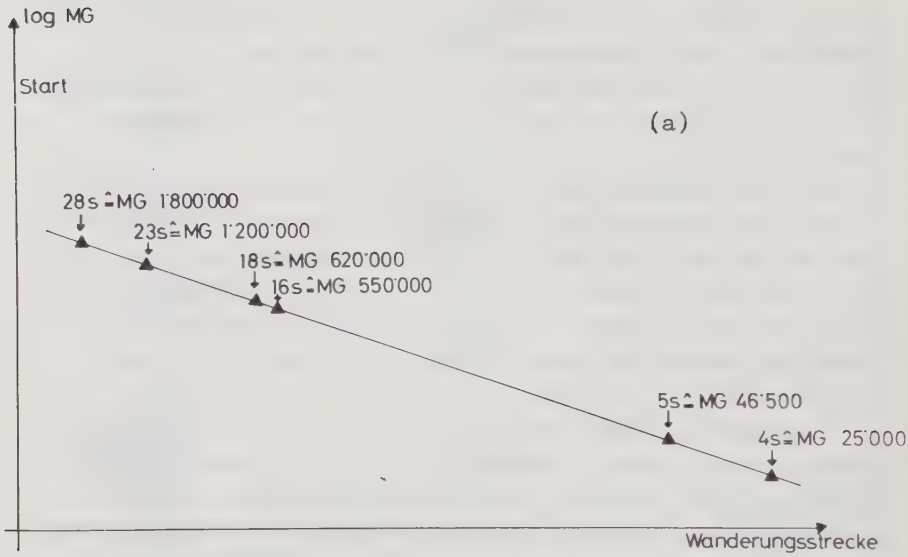
külen bestand, die den ersten Teil des Gels wegen ihrer Größe zwar noch durchwanderten, in den zweiten Abschnitt aber nicht mehr eindringen konnten. Wegen dieses Nachteils einer Ungenauigkeit wurden solche Gele nicht weiter verwendet.

Die regelmäßig auftretenden Gipfel in Bereichen $<4s$ wurden als polydisperse Abbauprodukte von größeren Molekülen betrachtet. Dies zeigten auch Elektrophoresen mit der o.a. RNS, die 10 Minuten bei $37^{o}C$ mit 10 ug Ribonuklease/ml der Lösung behandelt worden war. Es zeigten sich völlig heterogen verteilte Banden mit einem Maximum bei 4s und weit kleiner.

Zur sicheren Einordnung der als 28s, 18s und 4s angenommenen Gipfel nach Trennung in der Elektrophorese wurden diese Bereiche aus einem Saccharose-Gradienten einzeln gesammelt und erneut in Äthanol gefällt. Diese Fraktionen wurden einzeln auf verschiedenen Gelen aufgetrennt. Wie aus Abb. 5 zu ersehen, erschienen die zuvor schon im Saccharose-Gradienten identifizierten Fraktionen im erwarteten Bereich, wobei der betreffende Gipfel zwar prominierte, aber jeweils in kleineren Bereichen zusätzliche Fraktionen zu sehen waren. Diese rühren wohl von einer teilweisen Degradation in kleinere Abbauprodukte her.

Die Auswertung dieser Elektrophoresen und solchen mit RNS aus E. coli und Calliphora erythrocephala sowie aus Bäckerhefe ergab reproduzierbar eine gute lineare Abhängigkeit der Wanderungsstrecke vom Logarithmus des Molekulargewichtes (70) (siehe unter 2.7.2.1.). Abb. 6a und b vermitteln die gewonnenen Abhängigkeiten, nach denen die Größe unbekannter RNS-Spezies auf Gelen verschiedener Konzentrationen bestimmt wurde.

Bei der Auftrennung von radioaktiv markierter RNS in der Elektrophorese zeigte sich, daß durch den Acrylamid-Anteil in der Scintillations-Lösung ^{3}H-Aktivität eine bedeutend schlechtere Ausbeute als die von ^{14}C ergab. So mußte bei Markierungsversuchen eine 5 bis 10-fach stärkere ^{3}H-Aktivität angeboten werden, um besonders in Doppelmarkierungsversuchen vergleichbare und registrierbare Meßwerte



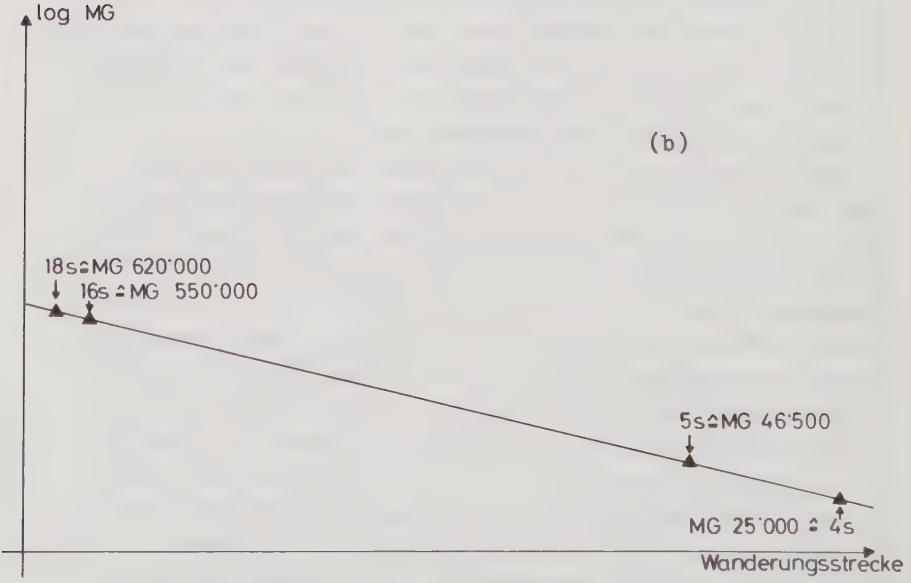


Abb. 6. Graphische Darstellung der experimentell ermittelten linearen Abhängigkeit der Wanderungsstrecken in der Acrylamid-Gel-Elektrophorese vom Logarithmus der Molekulargewichte von RNS (nach LABRIE (70)).
a.) 2,6% Gele b.) 7,5% Gele

zu erhalten. Bei höheren $^{14}C/^{3}H$-Verhältnissen wurde die Messung zusätzlich durch zu weite Überstrahlung der ^{14}C-Radioaktivität in den ^{3}H-Kanal erschwert.

3.2. Versuche mit RNS aus Rattenleber

3.2.1. In-vivo Markierung und Hormonstimulierung durch Cortisol

Die in-vivo Markierung von RNS aus Rattenleber erfolgte durch intraperitoneale Injektion von ^{3}H- oder ^{14}C-markierter Orotsäure. Es wurden Dosen von 50 µC ^{14}C-Orotsäure oder 100-200 µC ^{3}H-Orotsäure gespritzt. Nach einem Puls von einer Stunde erfolgte die Phenol-Extraktion der RNS bei 65°C aus dem Gesamtleber-Homogenat ohne weitere Auftrennung in einzelne Zellfraktionen.

Wie nach dieser Pulsdauer zu erwarten (108), zeigte sich bei der Auftrennung dieser RNS in der Elektrophorese eine Verteilung der UV-Absorption und Aktivität wie in Abb. 7.

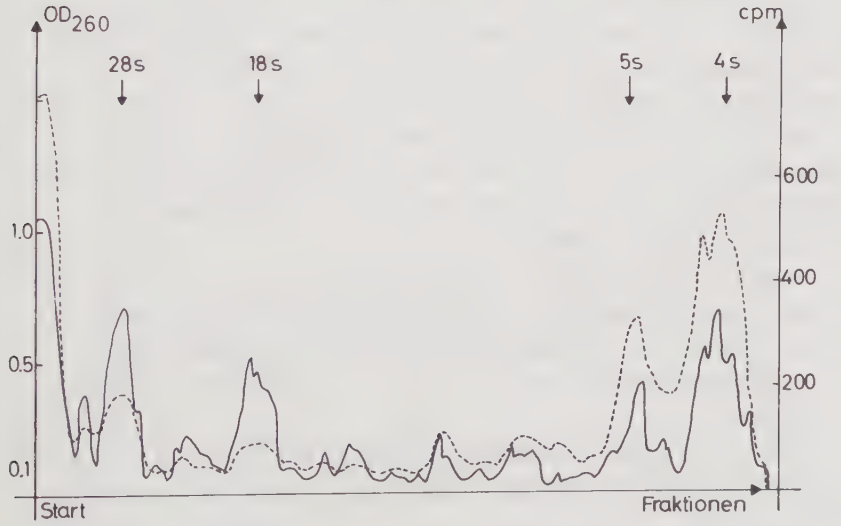


Abb. 7. RNS aus dem Gesamtleberhomogenat von Ratten nach 1-Stunden-Puls mit 200 µC ^{3}H-Orotsäure. Phenolextraktion bei 65°C. 2,6% Gel: Vorlauf 2 Stunden 5 mA/Gel. Lauf 1 Stunde 1,5 mA/Gel, 9,5 Stunden 6 mA/Gel. ——, OD_{260nm}; - - -, Radioaktivität in Cpm.

Man erkennt ribosomale Anteile und Fraktionen über 30s, der Herkunft des Materials entsprechend also auch wohl Kern-RNS der verschiedenen Spezies. Daneben existieren eine Reihe polydisperser Gipfel über den gesamten erfaßten Bereich des Gels verteilt. Es fällt eine relativ höhere Aktivität der kleinmolekularen Anteile auf.

Es wurde nun versucht, Unterschiede der RNS-Profile nach in-vivo Homonstimulierung zu fassen. Entsprechend der Theorie von der Gen-Aktivierung durch Hormone sollten nach Hormongabe Veränderungen im Bereich der kleinmolekularen RNS-Spezies zu erwarten sein (mRNS). Es war zu erwarten, spezifische mRNS leichter zu erfassen, wenn man sie von den Orten ihrer funktionellen Bestimmung isolierte, den Polyribosomen. Gleichzeitig sollte sie aber auch frei im Zytoplasma, entweder durch die Prozedur der Präparation losgelöst oder noch auf dem Transport vom Kern zu den Ribosomen, nachzuweisen sein.

Je drei Ratten erhielten 2,5 mg Cortisol bzw. nur Tris 7,9-Puffer i.p. gespritzt. Nach einer Stunde folgte die Injektion von 200 µC ^{3}H- (bei den Testtieren) und 50 µC ^{14}C-Orotsäure (bei den Kontrolltieren). Nach 10 Minuten wurden die Tiere getötet. Die Isolierung von gereinigten Ribosomen erfolgte wie unter 2.4.2. beschrieben. Zur Phenolextraktion bei 65°C wurden diese gereinigten Ribosomen und der Überstand bei der letzten Zentrifugation benutzt, der Membranbestandteile wie auch bereits von den Ribosomen abgetrennte mRNS und freie zytoplasmatische mRNS enthalten sollte.

Wegen der Technik der Doppelmarkierung war es möglich, die RNS aus Test- und Kontroll-Tieren gemeinsam zu verarbeiten, so also unter identischen Bedingungen.

Typische Ergebnisse solcher Versuche zeigt z.B. Tabelle 4.

Es ist deutlich, daß die Ausbeute an Aktivität im Verhältnis zu der ursprünglich injizierten äußerst gering war.

Tabelle 4

	Überstand	Sediment(Ribosomen)
Kontrolle (^{14}C)	2300 Cpm/mg RNS	1650 Cpm/mg RNS
Test (^{3}H)	8640 Cpm/mg RNS	8150 Cpm/mg RNS
Gesamt	9,6 mg	3,0 mg

Die Auftrennung in der Elektrophorese auf Gelen verschiedener Konzentrationen zeigt Abb. 8. Auf eine weitere Darstellung wird verzichtet, da die Ergebnisse sich glichen in verschiedenen Versuchen und bei Kontroll- und Test-Tieren. Die RNS aus dem Ribosomen-Sediment zeigt eine typische Verteilung mit einem 28s-, 18s- und 4s-Gipfel sowie einigen Zwischenfraktionen. Die RNS aus dem Überstand enthält eine große Zahl von heterogenen Fraktionen, hauptsächlich zwischen 18s und 4s. Die ribosomalen Anteile treten wesentlich geringer in Erscheinung. Auch die schärfere und genauere Auftrennung in 7,5 % Gelen erfaßte keine sicheren Veränderungen des in Abb. 8c dargestellten Profils nach Hormonbehandlung.

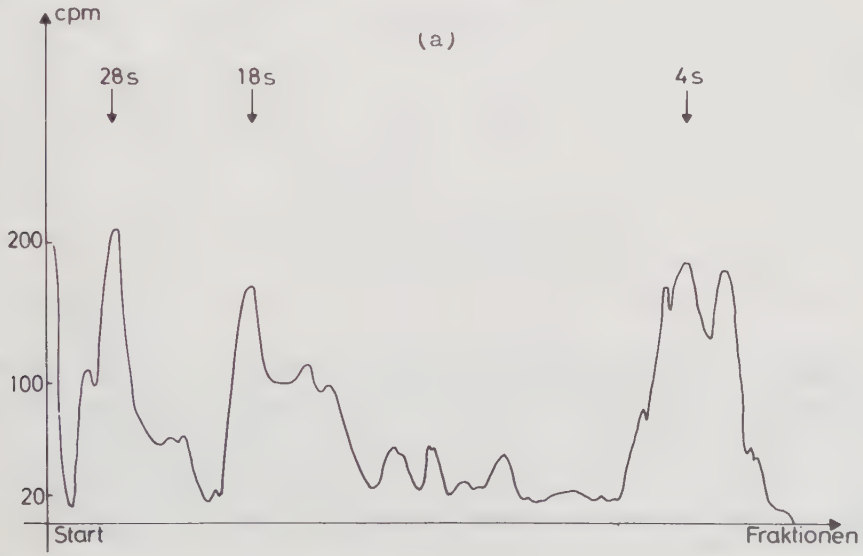


Abb. 8. Erklärung siehe umseitig.

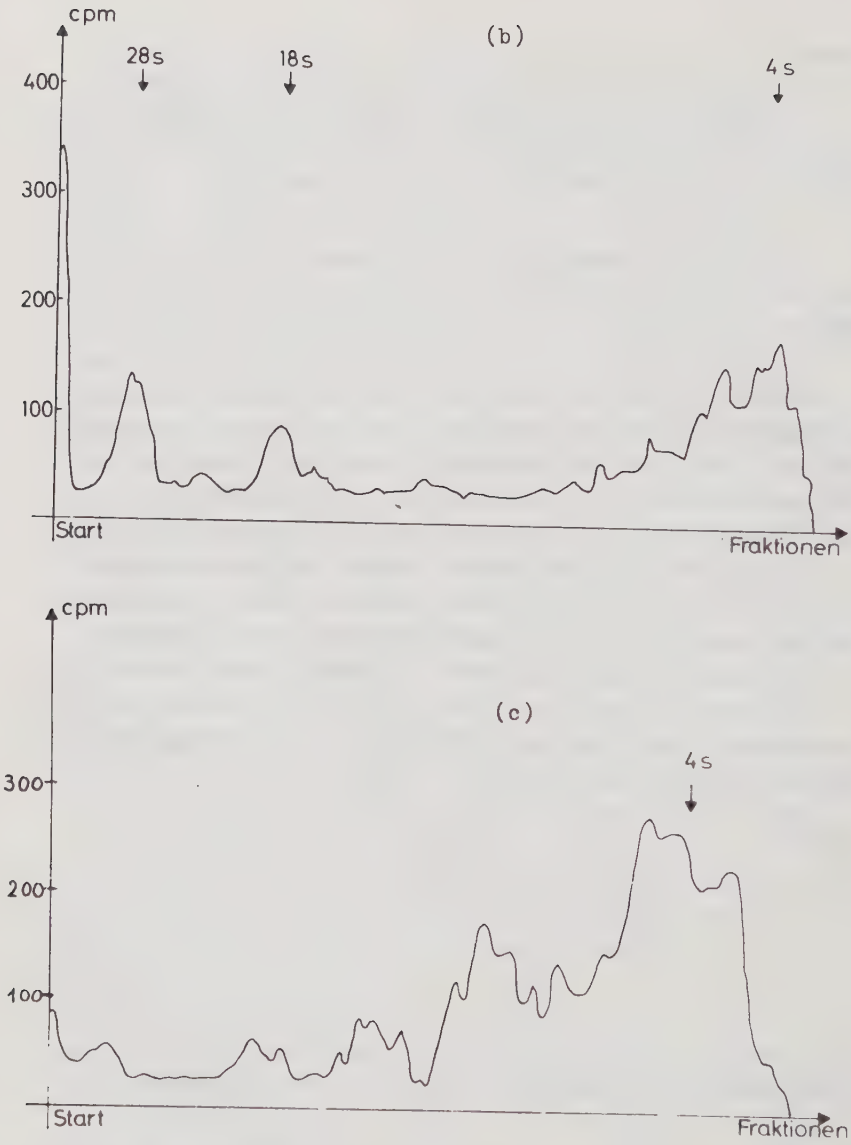


Abb. 8. Radioaktivitätsprofile von RNS aus Rattenleber nach Cortisolstimulierung (1 Stunde mit 25 mg Cortisol i.p.) und in-vivo Doppelmarkierung über 10 Minuten mit 50 µC ^{14}C-Orotsäure (Kontrolle) und 200 µC ^{3}H-Orotsäure (Test) je Ratte. Phenolextraktion bei 65°C. Da identische Profile für Test und Kontrolle, Wiedergabe nur einer Kurve. a.) RNS aus Sediment nach 2.4.2. b.) RNS aus Überstand nach 2.4.2. a.) und b.) jeweils 2,6% Gele, Elektrophoresebedingungen wie in Abb. 7. c.) RNS aus Überstand nach 2.4.2. 7,5% Gel, Elektrophoresebedingungen wie Abb. 3b.

3.2.2. In-vitro synthetisierte RNS

Zur in-vitro Synthese von RNS wurde ein System nach LUKACS und SEKERIS (80) benutzt. Es erfolgte eine Synthese aus Nukleosidtriphosphaten in Anwesenheit von Magnesium-, Mangan(II)- und Ammonium-Jonen durch gereinigte Kerne oder durch Kernsediment, das durch hypotonische Lysis solcher Kerne gewonnen worden war. Eines der Nukleosidtriphosphate, UTP, war mit ^{14}C in 4-Stellung des Uracils radioaktiv markiert (es wurde teilweise auch ^{3}H-markiertes UTP verwendet). Zum Studium von Hormon-bedingten Veränderungen wurden die Kerne, bzw. das Kernsediment, vor dem Test bei 37°C 10 Minuten mit in Äthanol gelöstem Cortisol in einer Konzentration von 5 µg/ml vorinkubiert (8). Das Äthanol erreichte dabei höchstens eine Gesamtkonzentration von 2 %. Die Kontroll-Serien wurden mit reinem Äthanol inkubiert. Standardansätze enthält Tabelle 5.

Tabelle 5

Substanz	Menge
ATP	0,25 µMol
GTP	0,25 µMol
CTP	0,25 µMol
Kreatinphosphat	1,5 µMol
Kreatinphosphokinase	5,0 µMol
^{14}C- oder	0,1 µC
^{3}H-UTP	1,0 µC
Mangan(II)	1,0 µMol
Magnesium	1,5 µMol
Ammonium	20,0 µMol
Mercaptoäthanol	1,5 µMol
Tris-HCl	12,0 µMol
Kerne oder Kernsediment	≙ 100 µg DNS
Gesamtvolumen 150 ml	
pH 7,9	

Es wurden meist fünffache Standardansätze verwendet. Die Synthese erfolgte über 10 Minuten bei 37°C. Die RNS wurde nach der Phenol-Methode extrahiert (siehe unter 2.6.). Zur Charakterisierung dieser RNS wurden Aliquote mit einer durchschnittlichen ^{14}C-Aktivität von 50-60 000 Cpm auf Acrylamidgelen in der Elektrophorese getrennt.

In einer großen Reihe von Versuchen mit Kernen als auch Kernsediment wurden die angegebenen Jonen verschiedentlich kombiniert. Als konstante Veränderung der Synthese nach Hormon-Einwirkung ließ sich eine ca. 30 %ige Stimulierung der Gesamtsynthese nachweisen. Weiterhin zeigten die angegebenen Jonen einen gewissen Einfluß auf die Größe und die Verteilung der RNS. So stellte sich heraus, daß Mangan(II)- oder Magnesium-Jonen allein etwa gleiche Ergebnisse lieferten, zusammen jedoch eine geringere Gesamtsynthese und einen geringeren Hormoneffekt bezüglich der Stimulierung lieferten. Es war auch bemerkenswert, daß unter Beteiligung von Ammoniumjonen die Anteile der höhermolekularen Gruppen stärker vertreten waren. Ein repräsentatives Beispiel für die Verteilung einer solcherart synthetisierten und aufgetrennten RNS zeigt Abb. 9.

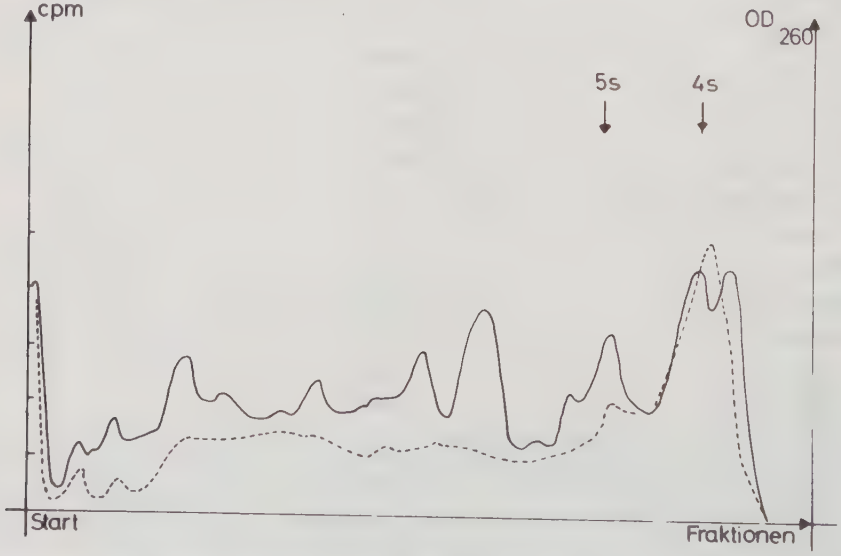


Abb. 9. Radioaktivitätsprofil von in-vitro synthetisierter RNS (nur Kontrollversuche). Synthesebedingungen wie in Tabelle 5. Phenolextraktion bei 65°C. 2,6% Acrylamid-Gele, Elektrophoresebedingungen wie in Abb. 6. —, Radioaktivität in Cpm;- - OD_{260nm}.

Es mußte festgestellt werden, daß sich mit diesem System keine Hormon-spezifischen Veränderungen der RNS-Größe und -Verteilung aufdecken ließen. Es ließ sich lediglich festhalten, daß das angewandte Synthese-System RNS lieferte, die nach ihrer Größe (in der elektrophoretischen Beweglichkeit gemessen) einer sinnvollen teilweise ribosomalen 28s- und 18s- sowie 5s- und 4s-Spezies, wie vielleicht auch heterogener DNS-ähnlicher RNS entsprach.

Die Ergebnisse der Elektrophoresen waren auch besonders deshalb unbefriedigend, weil Basenanalysen von RNS, mit Kernsediment in dem o.a. System synthetisiert, sowohl mit Mangan(II)- als auch Magnesium-Jonen eine Hormon-bedingte Veränderung des AU/GC-Quotienten ergeben hatten. Die Methode der Basenanalyse folgte Arbeiten von LANE (72). Repräsentative Ergebnisse von Basenanalysen zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6

Testbedingungen	Basenanalysen					mittlere
	A	U	G	C	AU/GC	Abweichung
Kontrolle	15,75	26,30	26,65	31,30	0,725	± 0,023
Mangan Cortisol	16,80	29,20	25,40	28,60	0,823	± 0,029
Kontrolle	13,35	25,95	30,90	29,80	0,647	± 0,019
Magnesium Cortisol	12,10	30,05	24,05	33,80	0,730	± 0,045

Diese Hormoneffekte auf den Aufbau der RNS fanden mit den angewandten Methoden kein Korrelat in Veränderungen der Größe oder Verteilung.

Im Hinblick auf das Ziel dieser Arbeit schien das Cortisol-System zur Erfassung von Hormon-spezifischen Veränderungen in der Größenverteilung von neu synthetisierter RNS oder von neu auftretenden Spezies nicht geeignet.

3.3. RNS aus der Epidermis von Calliphora erythrocephala Meig

Als neues Versuchstier wurden die Larven der Schmeißfliege Calliphora erythrocephala Meig benutzt. Wie in der Einleitung kurz dargelegt, bietet dieses Versuchstier zum Zeitpunkt der Verpuppung günstige Bedingungen, wenn man Veränderungen der RNS-Synthese durch Stimulierung mit einem Hormon, hier das Steroid Ecdyson, erfassen will.

Wie erwähnt, imponiert zu diesem Zeitpunkt besonders eine Steigerung der Aktivität des Enzyms Dopa-Decarboxylase. Unter diesen extremen physiologischen Verhältnissen sollte es möglich sein, Veränderungen der RNS-Synthese vor allem im Hinblick auf eine spezifische Messenger-RNS für dieses Enzym beobachten zu können.

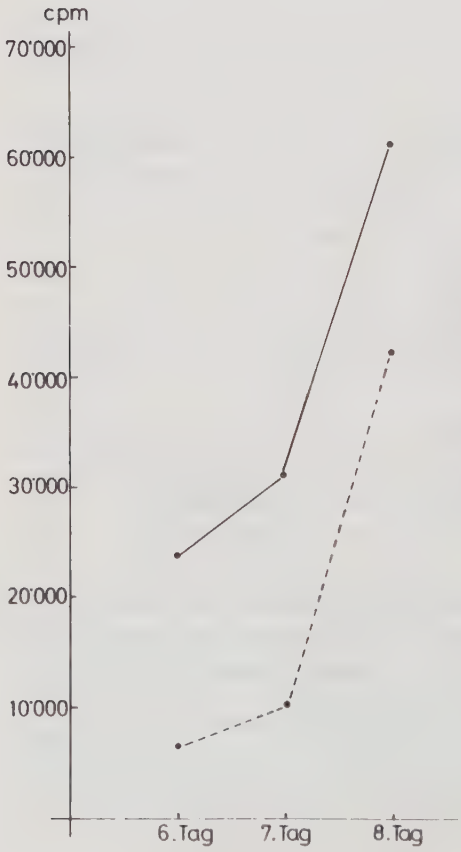


Abb. 10. Spezifische Radioaktivität (Cpm/mg RNS) von RNS aus dem zytoplasmatischen Überstand bzw. dem Kernsediment (siehe unter 2.4.1.) der Epidermis von Calliphora erythrocephala am 6., 7. und 8. postembryonalen Entwicklungstag. 1 Stunde Puls mit 2 µC ^{3}H-Uridin je Larve. Phenolextraktion bei 65°C. ——, Sediment; - - -, Überstand.

3.3.1. In-vivo Hormon-Effekt

Es wurden zunächst 6, 7 und 8 Tage alte Larven verwendet, die einen Puls durch 2 µC ^{3}H-Uridin je Tier über eine Stunde erhalten hatten. Nach Trennung in Kerne und zytoplasmatischen Überstand (siehe unter 2.4.1.) folgte die Extraktion der RNS nach der Phenolmethode bei 65°C (siehe unter 2.6.). Aliquote dieser RNS wurden in einer Lösung auf Dioxan-Basis im Scintillationszähler gemessen (siehe unter 2.7.2.).

Abbildung 10 gibt die spezifische Aktivität in Cpm/mg RNS wieder. Man sieht eine überraschende Steigerung der spezifischen Aktivität bis zum 8. Tag, die sich besonders bei der RNS aus dem zytoplasmatischen Überstand bemerkbar macht. Ohne weitere Spezifizierung spiegelt dies wohl die Vorbereitung des Tieres auf die gewaltigen Leistungen der Verpuppung wieder, einen hauptsächlich durch Ecdyson gesteuerten Prozess.

Die Auftrennung dieser RNS in der Acrylamid-Gel-Elektrophorese zeigen die Abbildungen 11 a bis f. Es treten konstant große Gipfel bei >28s, 23-26s, 16-14s und um 4s auf, aber auch eine Reihe von heterogenen Gruppen über den ganzen erfaßten Bereich.

Sichtbar an den Verschiebungen des UV- und Aktivität-Profils scheint zum Zeitpunkt der Verpuppung, um den 8. Tag, die stärkste de-novo RNS-Synthese zu kleineren Molekulargewichtsgruppen verlagert zu werden. Insbesondere prominieren die Gruppen zwischen 16s und 4s, ersichtlich in beiden verwendeten Zellfraktionen. Die konstanten Gipfel bei 23-26s und 16s dürften der rRNS in der Epidermis bei Calliphora erythrocephala entsprechen.
Es war interessant, daß nach der Pulsdauer von einer Stunde bereits ribosomale Anteile markiert zu finden waren, also auch sie reichlich neu synthetisiert wurde.

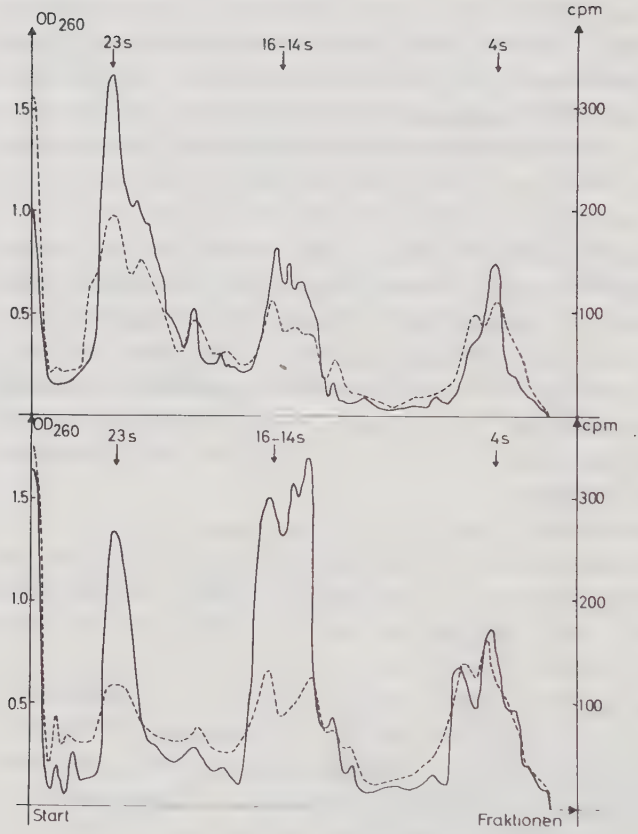


Abb. 11. Erklärung siehe S. 40.

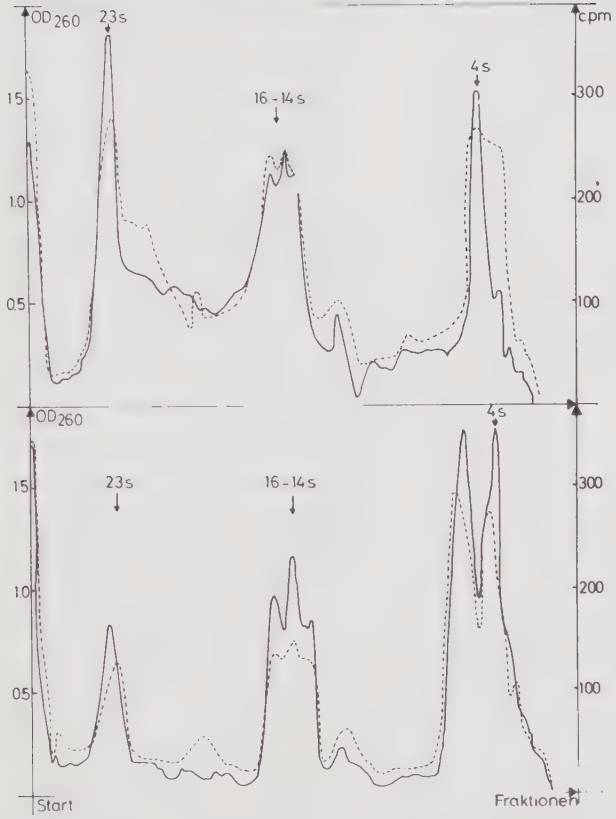


Abb. 11. Erklärung siehe S. 40.

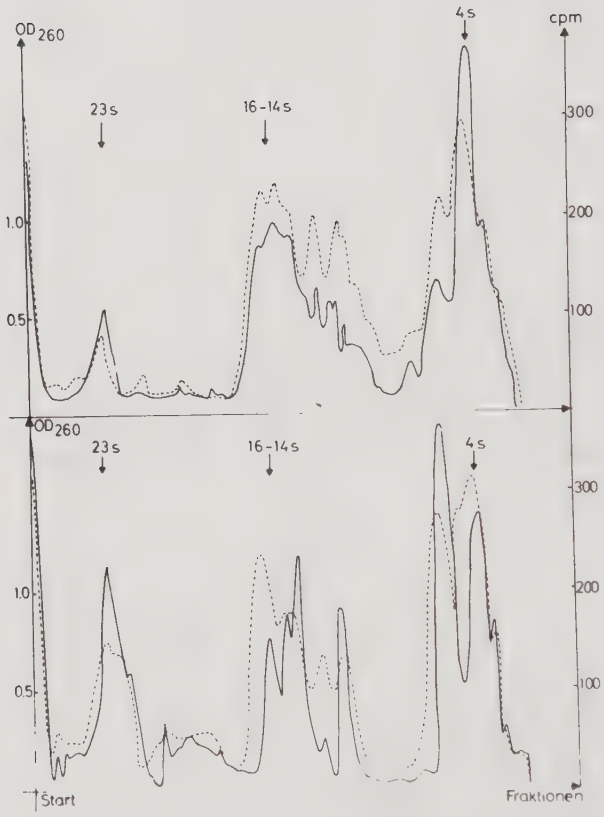


Abb. 11. RNS aus dem zytoplasmatischen Überstand bzw. dem Kernsediment (siehe unter 2.4.1.) der Epidermis von 6, 7 und 8 Tage alten Larven von Calliphora erythrocephala. Phenolextraktion bei 65°C. 2,6% Gele, Elektrophoresebedingungen wie in Abb. 3a.
a.) Zytoplasmatischer Überstand 6. Tag.
b.) Kernsediment 6. Tag.
c.) Zytoplasmatischer Überstand 7. Tag.
d.) Kernsediment 7. Tag.
e.) Zytoplasmatischer Überstand 8. Tag.
f.) Kernsediment 8. Tag.

3.3.2. In-vivo Hormon-Stimulierung nach Schnürung

Die ersten Versuche dieser Art erfolgten mit durchschnittlich 30 Kontroll- wie Test-Tieren. Um eine solche Zahl geeigneter Test-Tiere zu erhalten, mußten ungefähr 1000 Larven geschnürt werden. Nach Selektion der Tiere wurden zwei Gruppen gebildet, wobei eine möglichst zufällige Verteilung erreicht werden sollte. Die Hormon-Stimulierung erfolgte mit 1 CE (1 Calliphora-Einheit ≙ 0,01 µg) Ecdyson in 1 µl Tris 7,9-Puffer. Die Kontrolltiere erhielten nur diesen Puffer gespritzt. Nach 2,5 Stunden folgte die Injektion von je 2 µC ^{3}H-Uridin in 5 µl Tris 7,9. Nach einer weiteren Stunde wurden die Tiere präpariert, die Kerne und der zytoplasmatische Überstand (siehe unter 2.4.1.) von Epidermiszellen isoliert und die RNS bei 65°C nach der Phenol-Methode extrahiert. So konnte man z.B. RNS erhalten, deren Aktivität im Überstand bei den Kontroll-Tieren 91 500 Cpm, bei den Hormon-behandelten Tieren 195 000 Cpm, im Sediment mit Kernen 143 000 Cpm bei Kontroll-Tieren und 360 500 Cpm bei Hormon-behandelten Tieren betrug.

Dies entsprach einer Steigerung der RNS-Synthese von 113 % bzw. 152 %. In den weiteren Versuchen schwankte diese Steigerung zwischen 30 % und 160 %. Der Grund hierfür ist unklar.

Die Auftrennung dieser RNS in der Elektrophorese ergab im Wesentlichen dieselben Profile wie in Abb. 11 e und f. Da geringe Unterschiede auch durch Artefakte hätten erklärt werden können, wurde in den folgenden Versuchen nur mit Doppelmarkierung gearbeitet, deren Vorteile bereits geschildert wurden (siehe unter 2.5.).

So wurden z.B. je 30 Tiere ausgewählt. Die Hormon-Stimulierung erfolgte mit je 4 CE Ecdyson in 2 µl Tris 7,9, Kontroll-Tiere erhielten nur Puffer gespritzt. Nach 3 Stunden folgte die Injektion der Markierungssubstanzen. Es wurde ^{3}H- bzw. ^{14}C-markierte Orotsäure verwendet. Da die spezifische Aktivität der ^{3}H-Orotsäure mit 17 000 mC/mMol 280x höher als die der ^{14}C-Orotsäure lag, mußten diese Lösungen in Tris 7,9 durch Zugabe von nichtmarkierter Orot-

säure ausgeglichen werden. So wurden je Tier 20 µC ^{3}H- bzw. 2 µC ^{14}C-Aktivität in je $1{,}6 \times 10^{-2}$ uMol Orotsäure gespritzt, in einem Volumen von 8 µl Tris 7,9. Um Isotopeneffekte zu vermeiden, wurde die Art der Markierung zwischen Kontroll- und Test-Tieren in verschiedenen Versuchen vertauscht.

Nach 90 Minuten wurde die Cuticula präpariert und entweder aus der gesamten Epidermis oder dem zytoplasmatischen Überstand nach Isolierung der Kerne (siehe unter 2.4.1.) die RNS nach der Phenolmethode bei 37°C extrahiert. Aus je 30 Kontroll- bzw. Test-Tieren konnte man so RNS gewinnen wie z.B. in Tabelle 7.

Tabelle 7

Extrahiertes Material	RNS-Menge (mg)	Spezifische Aktivität (Cpm/mg RNS)	
		^{3}H (Kontrolle)	^{14}C (Hormon-Test)
Gesamt-Gewebe	0,84	258 000	20 000
Zytoplasmatischer Überstand	0,09	308 000	36 000

Diese RNS wurde in der Acrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt, mit demselben Material je auf 2,6 und 7,5 % Gelen. Ein repräsentatives UV-Profil von RNS aus der ganzen Cuticula von 2,6 bzw. 7,5 % Gelen zeigt Abb. 12. Man kann deutlich einen 23-26s-, 16-14s- und um 4s-Gipfel unterscheiden, auf den 7,5 % Gelen aber zusätzlich sehr scharf eine Reihe von Zwischenbanden, die in dieser vielfältigen Form, wie in der Abbildung dargestellt, konstant zu beobachten waren. Ebenso vielfältig, besonders in der scharfen Auftrennung der 7,5 % Gele, zeigte sich das Aktivitätsprofil. Grundsätzlich hatte die Art des extrahierten Materials (gesamte Cuticula oder zytoplasmatischer Überstand) einen Einfluß auf die Profile nur insofern, als die höhermolekularen Anteile im zytoplasmatischen Überstand stärker vertreten waren.

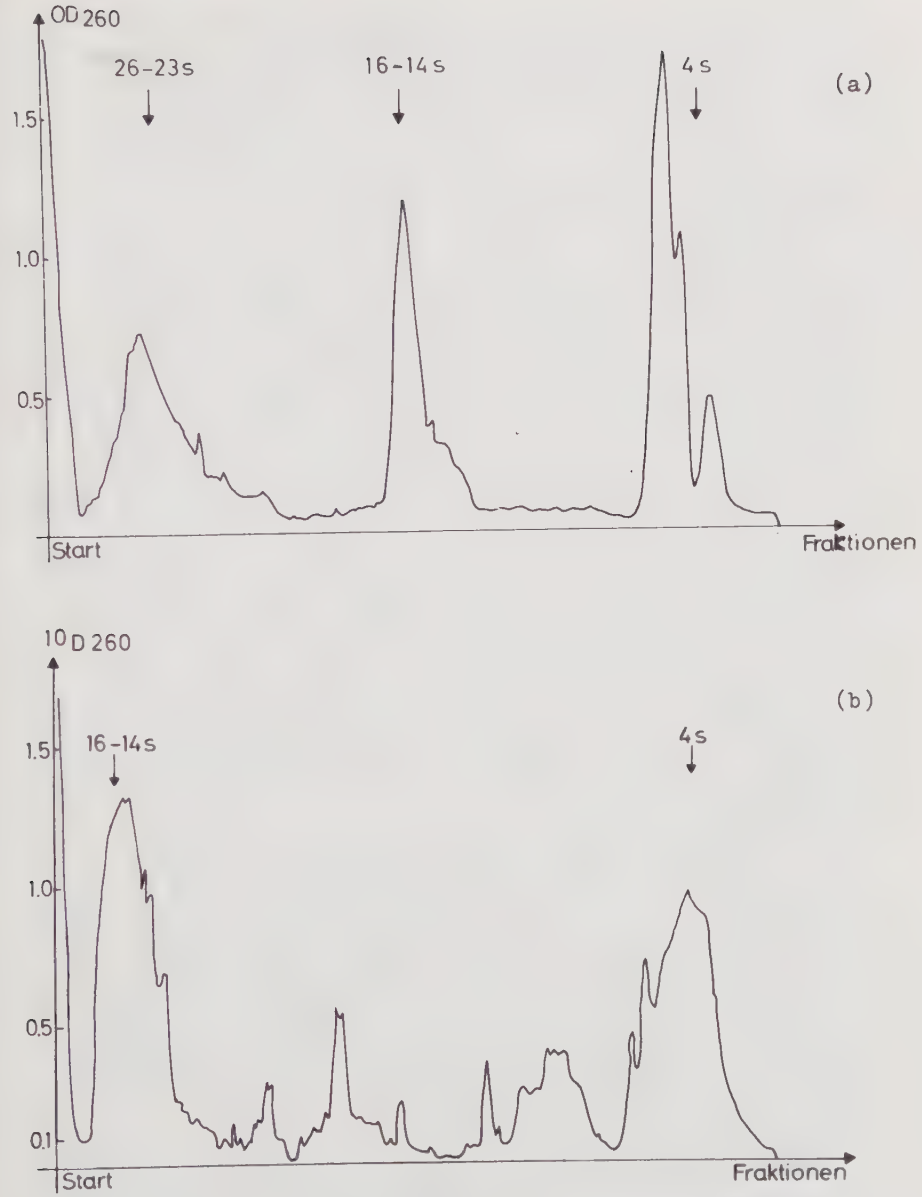


Abb. 12. UV-Profile von RNS aus dem Gesamthomogenat von Epidermiszellen von 8 Tage alten Larven von Calliphora erythrocephala. Phenolextraktion bei 37°C.
a.) 2,6% Gel, Elektrophoresebedingungen wie in Abb. 3a.
b.) 7,5% Gel, Elektrophoresebedingungen wie in Abb. 3b.

Bei der Auswertung der Aktivitätsprofile konnte mit großer Übereinstimmung in sechs Versuchsreihen, mit deren Material jeweils mehrere Elektrophoresen möglich waren, ein deutlicher Unterschied zwischen Kontrolle und Hormon-Test beobachtet werden. Ersichtlich am $^{3}H/^{14}C$-Quotienten verlagert sich nach Hormon-Stimulierung die Aktivität der extrahierten RNS deutlich zu kleineren Molekulargewichtsbereichen. In anderen Versuchen hatte sich schon die zum Teil große Steigerung der Gesamtsynthese zeigen lassen. Es konnte nun weitergehend registriert werden, daß mit großer Konstanz in vielen Versuchsreihen und verschiedenen Elektrophoresen, also unter zum Teil unterschiedlichen äußeren Bedingungen, zwei Gipfel unter Hormon-Stimulierung auftraten, die in den Kontrollprofilen nur angedeutet waren. Ihre Identifikation gelang nur durch die scharfe Auftrennung der 7,5 % Gele, da auf den 2,6 % Gelen diese Gipfel zwar angedeutet waren, jedoch häufig durch angrenzende überlagert wurden. Die Abbildungen 13 a und b stellen repräsentative Aktivitäts-Profile dieser Ergebnisse dar. Auffallend war, daß der Effekt bezüglich dieser zwei Gipfel bei Verwendung des zytoplasmatischen Überstandes wesentlich deutlicher zu unterscheiden war. Die Stimulation wirkte sich hier besonders auf das Erscheinen bzw. die Verstärkung dieser zwei Fraktionen aus.

Zur annähernden Molekulargewichtsbestimmung nach der elektrophoretischen Beweglichkeit in der Acrylamid-Gel-Elektrophorese wurde die Methode nach LABRIE (70) benutzt (siehe unter 2.7.2.1.). Hierfür standen gefärbte Gele, UV-Absorptionskurven und Radioaktivitätskurven zur Verfügung. Für die zwei nach Ecdyson-Behandlung neu bzw. verstärkt aufgetretenen Fraktionen ergaben sich aus zwölf Bestimmungen als graphisch ermittelte Molekulargewichte 156 000 und 275 000 als Mittelwerte.

Es wurde angenommen, daß diese RNS-Fraktionen in einem mittelbaren Verhältnis zu der Ecdysonwirkung zu sehen seien. Es sollte weiter untersucht werden, inwieweit eine RNS dieser Größe eine Messenger-RNS-Rolle spielen könnte.

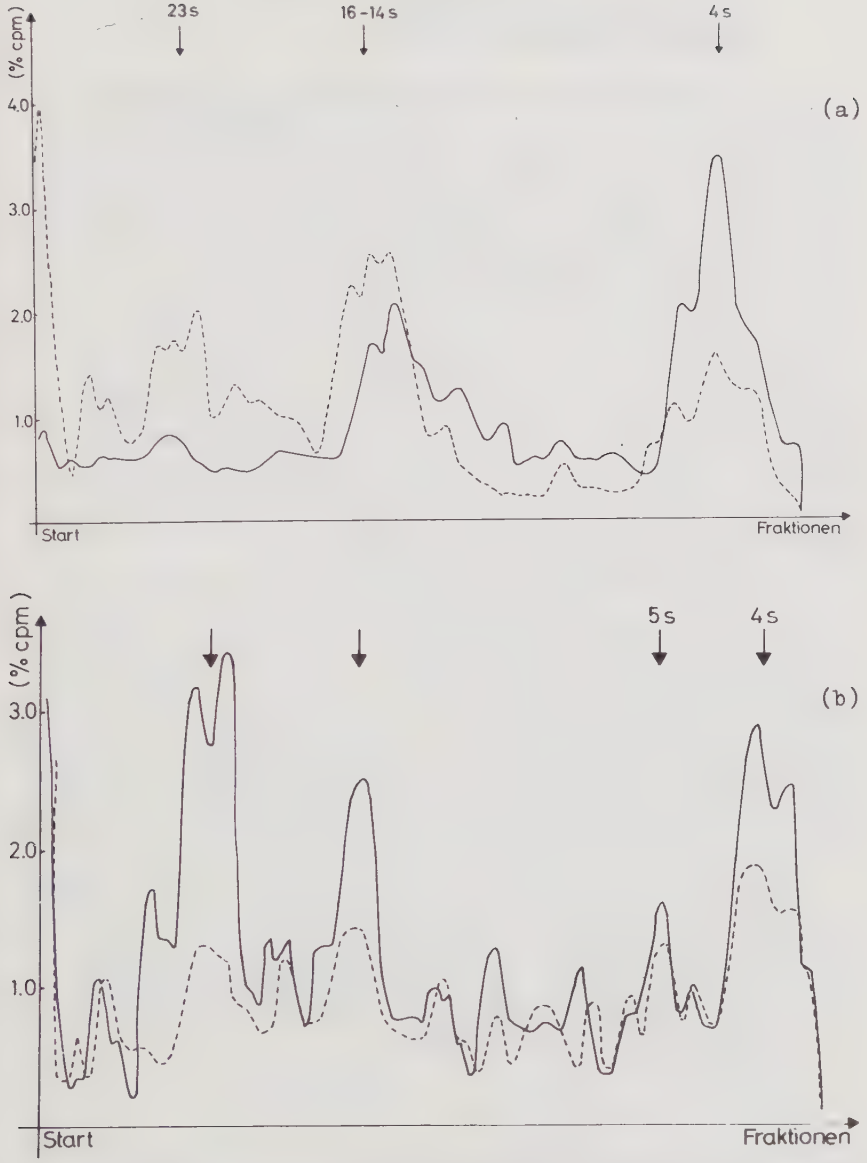


Abb. 13. RNS (Kontrolle und Hormon-Test) aus dem zytoplasmatischen Überstand von Epidermiszellen von Calliphora erythrocephala nach Schnürung, in-vivo Ecdysonstimulierung (Hormon-Test) und in-vivo Markierung mit ^{14}C(Kontrolle)- bzw. ^{3}H(Test)-Orotsäure. - - -, Kontrolle; ——, Hormon-Test.
a.) 2,6% Gel, Elektrophoresebedingungen wie in Abb. 3a.
b.) 7,5% Gel, Elektrophoresebedingungen wie in Abb. 3b.

3.3.3. Bestimmung des Molekulargewichtes von Insekten-Dopa-Decarboxylase

Als ein Kriterium, eine RNS als Messenger identifizieren zu können, läßt sich u.a. das Molekulargewicht heranziehen. Es ist zumindest festzustellen, ob die betreffende RNS als Matrize ein Protein mit sinnvoller und möglicher Größe kodieren könnte. Nützlich erscheint hierbei der Vergleich mit einem Protein bekannter Größe.

In dem angewandten System, das von einer Ecdyson-Stimulierung ausging, konnte man, wie unter 1.1.2. ausgeführt, besonders eine Stimulierung des Enzyms Dopa-Decarboxylase erwarten. Die unter der Hormon-Stimulierung besonders aufgefallenen RNS-Fraktionen konnten unter Umständen Messenger-Funktionen für dieses Enzym haben. Durch einen Vergleich der Molekülgrößen sollte festgestellt werden, ob derartige Beziehungen möglich seien.

Das Enzym wurde nach einer Methode von SEKERIS (110) aus weißen Vorpuppen von Calliphora erythrocephala durch verschiedene Anreicherungsschritte gewonnen. Die Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgte durch Glycerin-Gradienten-Zentrifugation in einem 5-20 % Gradienten bei 36 000 U./Min. über 15 Stunden in einem SW 41 Rotor. Als Vergleichssubstanzen wurden Katalase (MG 230 000), Aldolase (MG 80 000) und Albumin (MG 67 000) zugefügt. Das UV-Profil zeigte für Dopa-Decarboxylase einen Gipfel bei 140 000 bis 120 000.

Nimmt man als mittleres Molekulargewicht für eine Aminosäure ca. 100 und für ein Nukleotid ca. 300 an, so müßte eine Messenger-RNS für Dopa-Decarboxylase, die nur das Signal für dieses Enzym trägt, eine ungefähre Größe von MG 1 260 000 bis 1 080 000 haben.

4. DISKUSSION

Die Acrylamid-Gel-Elektrophorese und die damit gefundenen RNS-Spezies

Die Technik der Acrylamid-Gel-Elektrophorese hat in den letzten Jahren auf vielen Gebieten eine breite Anwendung gefunden. Durch ihre besonderen Eigenschaften (siehe unter 1.3.4.) erlaubt sie eine sehr scharfe Auftrennung von Makromolekülen nach deren Größe, Konfiguration und Ladungsverhältnissen. Es hat sich bei den Vorversuchen zu dieser Arbeit gezeigt, daß die kontinuierliche, reine Acrylamid-Gel-Elektrophorese, im Gegensatz zu der diskontinuierlichen mit verschiedenen Konzentrationsstufen oder Gemischen mit z.B. Agarose, für die besondere Fragestellung die besten Ergebnisse liefert. Jene Systeme waren nicht genügend genau reproduzierbar oder lieferten teilweise unkontrollierbare Artefakte (25, 46, 77, 78, 84, 91, 92).

Es konnte am Beispiel von RNS aus Rattenleber (siehe Abb. 3 a und b) gezeigt werden, daß diese Technik in der Trennschärfe gegenüber z.B. der Saccharose-Gradienten-Zentrifugation bedeutend überlegen ist. Zusätzlich ist es möglich, sehr kleine Substanzmengen, hier um 20 ug, aufzutrennen und im UV- oder Radioaktivitätsprofil nachzuweisen. Hierzu kam noch der Vorteil, daß durch die Bedingungen der Elektrophorese die verwendeten Materialien weitgehend von Ribonukleasen befreit werden können.

Vorteilhafterweise lassen sich die Versuchsbedingungen wie Konzentration des Gels und so der erfaßte Molekulargewichtsbereich, der pH-Wert der Pufferlösungen, Stromstärke und Laufdauer einfach registrieren und steuern. Man konnte so unter gleichen Bedingungen gut reproduzierbare Profile erhalten, die es mit der Methode von LABRIE (70) ermöglichten, das Molekulargewicht einer interessierenden RNS-Spezies einfach graphisch zu ermitteln.

Es konnte mit 2,6 % und 7,5 % Gelen gezeigt werden, daß die gleiche RNS aus dem zytoplasmatischen Überstand von Rattenleber, die in der Saccharose-Gradienten-Zentri-

fugation drei Hauptgipfel bei 28s, 18s und 4s aufweist, durch die Elektrophorese in eine Reihe von weiteren scharfen Gipfeln bei 5s, zwischen 5s und 18s sowie um 28s und größer aufgetrennt werden kann.

Entsprechend der Herkunft des Materials kann man die 4s-Fraktion als Transfer-RNS betrachten, die 5s-RNS könnte der 28s-assoziierten 7s, nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit auch 5,5s-RNS entsprechen (93). Die 28s und 18s-Gruppen sind ribosomale Anteile (bei Säugetieren) (69, 71, 130, 135). Die Herkunft der heterogenen Gruppen zwischen 4s und >28s dürfte unterschiedlich sein. Sicher kann man bei den verschiedenen Schritten der Präparation und Extraktion einen Abbau durch Ribonukleasen nicht vermeiden. Es resultieren daher wohl eine Reihe von unkontrollierbaren Abbauprodukten.

Zytoplasmatische DNS-ähnliche RNS in freien oder Ribosomen angelagerten "Informosomen" (123, 124) wird von vielen Autoren mit Größen beschrieben, die von 4s bis über 35s reichen (5, 86, 94, 105, 123, 124).

Bei den angewandten Methoden der Isolierung von Zellen und verschiedenen Zellfraktionen lassen sich Verunreinigungen z.B. des zytoplasmatischen Überstandes durch Kernbestandteile nicht vermeiden. Man extrahiert daher sicher auch Kern-RNS und deren natürliche und unbeabsichtigte Abbauprodukte. Darunter zählen die ribosomale Precursor-RNS mit ihren verschiedenen Zwischenstufen der "Reifung" bis zu den definitiven 28s- und 18s-Spezies (29, 37, 38, 39, 76, 104, 136, 141, 142), wie auch die primären Transcriptionsprodukte von DNS-ähnlicher Kern-RNS und deren sekundäre Um- und Abbauformen (5, 38, 94, 105, 123, 124, 125, 133, 134, 141, 142). Es dürfte auch die Temperatur der Phenolextraktion von Bedeutung sein, da nach GEORGIEV und MANTIEVA (39) bei Temperaturen von 60-65°C vorwiegend DNS-ähnliche RNS extrahiert wird.

RNS aus der Epidermis von Calliphora erythrocephala (in verschiedenen Entwicklungszeiten) konnte durch die Gel-Elektrophorese in mehrere Gruppen aufgetrennt werden. So ließen sich reproduzierbar Fraktionen bei >28s, 23-26s, 16-14s und um 4s registrieren, deren relativer Anteil ent-

wicklungsbedingten Schwankungen unterworfen ist (siehe unten). Bei unterschiedlichen Angaben in der Literatur über das Sedimentationsverhalten von Insekten-RNS (1, 33, 44, 127), das mit der elektrophoretischen Beweglichkeit nicht unbedingt identisch ist, kann man doch wohl mit CONGOTE (22) von Hauptgruppen bei 4s, 16-18s und 26-28s ausgehen. Die eigenen Ergebnisse würden mit diesen Angaben gut übereinstimmen (siehe Abb. 12). Die Herkunft der vielen Zwischenfraktionen von <4s bis >28s könnte ebenfalls wie bei dem Material aus Rattenleber erklärt werden, wenn auch entwicklungsbedingte Unterschiede in der Syntheseleistung der Zellen berücksichtigt werden müssen.

Veränderung der RNS-Größenverteilung unter Hormonwirkung

Veränderungen der RNS-Synthese und infolgedessen Veränderungen der RNS-Größenverteilung durch Hormon-Stimulierung sollten an Cortisol- und Ecdyson-abhängigen Systemen untersucht werden. Auch bei Verwendung z.B. von gereinigten Ribosomen, die einen hohen Anteil von mRNS erwarten ließen, gelang in Untersuchungen mit Cortisol bei in-vivo Versuchen lediglich eine Bestätigung der bekannten Stimulierung der Gesamt-RNS-Synthese um durchschnittlich 30 % (7, 74, 118). Spezifische Veränderungen im Sinne einer Hormon-induzierten de-novo Synthese von mRNS - analog der Theorie über den Wirkungsmechanismus der Hormone von KARLSON (57) - waren nicht sichtbar. Auch die elektrophoretische Auftrennung von in-vitro mit Rattenleber-Kernen synthetisierter RNS unter verschiedenen Bedingungen ließen keine sichere Veränderung der RNS-Größen erkennen. Das Profil der Abb. 9 läßt lediglich die Beobachtung zu, daß unter den herrschenden Bedingungen der Synthese RNS-Gruppen entstanden, die den in-vivo Größen ähnlich kamen. Man erkennt 28s-, 18s- und 4s-Gipfel in einer Relation zueinander, die je nach Jonenmilieu des Synthesegemisches geringe Unterschiede zeigte.

So war der Anteil der höhermolekularen Gruppen am stärksten bei Anwesenheit von Ammoniumjonen. Dieser Effekt läßt sich vielleicht allein durch einen vielfach beschrie-

benen hemmenden Einfluß der Ammoniumjonen auf die Ribonuklease erklären (50). Magnesium- und Mangan(II)-Jonen zeigten einen bezüglich der Gesamtsynthese additiven Effekt, ohne faßbare spezifische Unterschiede der RNS-Größe auch nach Hormon-Stimulierung. Über die Größe der RNS ließ sich so auch kein Merkmal einer Mangan- oder Magnesium-Abhängigkeit unter Hormon-Einfluß der beschriebenen unterschiedlichen RNS-Polymerasen gewinnen (75, 82, 97).

Basenanalysen von in-vitro unter Cortisol-Stimulierung synthetisierter RNS konnten dagegen zeigen, daß unter den Hormonbedingungen eine AU-reichere RNS gebildet wird. Dies steht im Einklang mit der vielfach beschriebenen und bekannten Steigerung der Synthese von DNS-ähnlicher, so auch mRNS und entsprechenden Enzymen nach Cortisol-Gabe (30, 31, 66, 73).

Unzulänglichkeiten der Methodik können für diese bezüglich der Größenunterschiede oder spezifischen Veränderung der RNS nach Cortisol-Gabe negativen Ergebnisse verantwortlich sein. Erschwerend wirkten sich etwa die geringen Ausbeuten an Radioaktivität bei Versuchen mit in-vivo markierter RNS aus Rattenleber aus, die eine schlüssige Beurteilung der Elektrophorese-Profile häufig unmöglich machten. Möglicherweise sind auch die Bedingungen der in-vitro Synthese nicht geeignet, Hormon-bedingte Änderungen der RNS-Größen etc. zu beobachten.

Es ist auch von Bedeutung, daß wahrscheinlich viele mRNS-Spezies gleiche oder nur wenig differierende Größen besitzen, da sie für Proteine gleicher oder sehr ähnlicher Größe kodieren. Bei Induktion nur einer Spezies unter vielen gleich großen muß es schwierig sein, sie von den anderen zu unterscheiden.

Da Cortisol eine ganze Reihe von Leberenzymen induziert (111), kann man davon ausgehen, daß im Test gleichzeitig eine Vielzahl von mRNS-Spezies erscheinen werden, unter Umständen auch für manche Enzyme mehrere Untereinheiten.

Es dürfte daher schwerfallen, die Summation dieser Vorgänge, die sich u.a. in der beschriebenen Steigerung der Gesamt-RNS-Synthese ausdrücken könnte, mit der angewandten

Technik aufzulösen.

Unter Ausnutzung der endogenen Hormonverhältnisse, die um den 8. Tag der Entwicklung der Larven von Calliphora erythrocephala einen Höhepunkt des Ecdysontiters bieten (119), ließen sich an diesem Versuchstier erste Hinweise auf eine Hormon-bedingte Verschiebung in den RNS-Größen erkennen. Es konnte zweifelsfrei gezeigt werden, daß mit der nahenden Verpuppung die kleineren Molekulargewichtsgruppen zwischen 16s und 4s ein immer stärkeres Gewicht bekommen, bei einer absolut gesehen großen Steigerung der Gesamt-RNS-Synthese.

In Schnürversuchen, die einen kontrollierten und synchronisierten Hormon-Test an einer großen Zahl von Tieren gestatten, ließ sich mit der Technik der Doppelmarkierung eine Ecdyson-abhängige Steigerung der Gesamt-RNS-Synthese nachvollziehen. Unter diesen Bedingungen gelang aber auch, neben der schon zuvor beobachteten generellen, höheren Aktivität der kleineren RNS-Gruppen, in der scharfen Auftrennung der 7,5 % Acrylamid-Gele reproduzierbar die Darstellung von zwei Fraktionen, welche anscheinend eine hervorragende Hormon-abhängige Synthese-Steigerung erfahren. Nach der Methode von LABRIE (70) entsprechen ihre mittleren Wanderungsstrecken in der Elektrophorese Molekulargewichten von 156 000 und 275 000.

Da man unter den herrschenden Bedingungen mit einer zumindest besonders hohen Aktivitätssteigerung des Enzyms Dopa-Decarboxylase rechnen kann, lag der Versuch nahe, Messenger-Eigenschaften der gefundenen RNS-Spezies für dieses Enzym anzunehmen. In der Gradienten-Zentrifugation hatte sich aber für das Enzym ein Molekulargewicht von 140 000 bis 120 000 ergeben. Überschlagsweise müßte eine mRNS mit der Information für dieses Protein ein Molekulargewicht von 1 260 000 bis 1 080 000 haben.

Könnten die beschriebenen RNS-Fraktionen dennoch als spezifische Messenger betrachtet werden?

Es ist für diese Diskussion wichtig, daß neben der Steigerung der Gesamt-RNS-Synthese in der Epidermis während der prä-pupparen Entwicklungszeit der Larven (im Gegensatz zu den Fettkörperzellen (22), ein treffender Beweis für die

Organspezifität des Hormons) gleichzeitig eine bedeutende Aktivitätszunahme der Ribonukleasen zu beobachten ist (117). Durch die Zellfraktionierung werden zusätzlich Proteasen und Ribonukleasen aktiviert (40). Es ist also möglich, daß viele der in der Elektrophorese aufgetrennten RNS-Gruppen unspezifische Abbauprodukte darstellen. Gegen eine solche, unspezifische und zufällige Entstehung der hier angesprochenen Spezies spricht die Regelmäßigkeit ihres Auftretens. Es wäre aber auch denkbar, daß es sich um Metaboliten von ribosomaler oder um mitochondriale RNS handelt, die nach der angewandten Markierungszeit, wie beschrieben, ebenfalls radioaktiv markiert erscheinen und bei der aktuellen Stoffwechsellage der Epidermiszellen eine hohe Syntheserate haben.

Von außerordentlichem Interesse ist aber die Tatsache, daß CHRISTENSON und Mitarbeiter (20) für Dopa-Decarboxylase aus Schweinenieren ein Molekulargewicht von 112 000 ermittelt haben und Untereinheiten dieses Enzyms mit Molekulargewichten von 57 000, 40 000 und 21 000 beschreiben. Nimmt man ähnliche Verhältnisse bei Insekten an, könnten die oben beschriebenen RNS-Fraktionen als Messenger Proteine mit einem Molekulargewicht von 31 000 und 17 300 kodieren, die Untereinheiten des Insektenenzyms darstellen könnten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wird die Anwendung der Polyacryamid-Gel-Elektrophorese zur Trennung von niedermolekularer RNS beschrieben. Als besonders geeignet hat sich ein modifiziertes System nach LOENING (77, 78) gezeigt. Es konnte an Beispielen mit in-vivo und in-vitro synthetisierter RNS aus Rattenleber und der Epidermis der Larven von Calliphora erythrocephala die besondere Eignung dieser Technik dargelegt werden.

2. In Hormontest-Versuchen mit Cortisol in-vivo und in-vitro wurde versucht, spezifische Veränderungen der RNS-Größe zu erfassen. Die in Basenanalysen angedeuteten spezifischen Veränderungen äußerten sich nicht registrierbar in den Verteilungsprofilen der RNS in der Elektrophorese.

3. Durch in-vivo Ecdyson-Stimulierung von geschnürten Larven von Calliphora erythrocephala konnte neben einer Steigerung der Gesamt-RNS-Synthese eine Hormon-bedingte Betonung der RNS-Molekulargrößen von 16s bis 4s beobachtet werden. Es wird über zwei Fraktionen berichtet, die mit einem Molekulargewicht von 156 000 und 275 000 als Messenger Untereinheiten des Insektenenzyms mit Größen von ungefähr 17 300 und 31 000 kodieren könnten. Die Molekulargewichtsbestimmung des Enzyms aus Vorpuppen ergab eine Größe von ungefähr 120 000 bis 140 000.

6. SCHRIFTENVERZEICHNIS

1. APPLEBAUM, S.W., R.P. EBSTEIN and G.R. WYATT: Dissociation of ribosomal ribonucleic acid from silk-moth pupae by heat and dimethylsulfoxide: evidence for specific cleavage points. J. Mol. Biol. 21, 29 (1966)

2. ASAI, H. and K. TAWADA: Enzymic nature of F-actin at high temperature. J. Mol. Biol. 20, 403 (1966)

3. ASAKURA, S.: F-actin adenosine triphosphatase activated under sonic vibration. Biochim. Biophys. Acta 52, 65 (1961)

4. ASAKURA, S., M. TANIGUCHI and F. OOSAWA: The effect of sonic vibration on exchangeability and reactivity of the bound adenosine diphosphate of F-actin. Biochim. Biophys. Acta 74, 140 (1963)

5. ATTARDI, G., H. PARNAS, M.-J.H. HWANG and B. ATTARDI: Giant-size rapidly labeled nuclear ribonucleic acid and cytoplasmic messenger ribonucleic acid in immature duck erythrocytes. J. Mol. Biol. 20, 145 (1966)

6. BARANY, M., A.F. TUCCI and T.E. CONOVER: The removal of the bound ADP of F-actin. J. Mol. Biol. 19, 483 (1966)

7. BARNABEI, O., B. ROMANO, G. di BITONTO and V. TOMASI: Factors influencing the glucocorticoid-induced increase of ribonucleic acid polymerase activity of rat liver nuclei. Arch. Biochem. Biophys. 113, 478 (1966)

8. BEATO, M., J. HOMOKI, I. LUKACS and C.E. SEKERIS: On the mechanism of hormone action. X. Increased template activity for RNA synthesis of rat liver nuclei incubated with cortisol "in vitro". Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 1099 (1968)

9. BEATO, M., J. HOMOKI and C.E. SEKERIS: On the mechanism of hormone action. XII. Uptake of 1,2-^{3}H-Cortisol by isolated rat liver nuclei. Exptl. Cell Res. 55, 107 (1969)

10. BEERMANN, W.: Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikation der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von Chironomus tentans. Chromosoma 5, 139 (1952)

11. BELOZERSKY, A.N. and A.S. SPIRIN: Chemistry of the nucleic acids of microorganisms. In: The nucleic acids III (Ed. Chargaff and Davidson). p. 147. Academic Press, New York, 1960.

12. BISHOP, D.H.L., J.R. CLAYBROOK and S. SPIEGELMANN: Elektrophoretic separation of viral nucleic acids on polyacrylamide gels. J. Mol. Biol. 26, 373 (1967)

13. BOCK, R.M. and N.S. LING: Devices for gradient elution in chromatography. Anal. Chem. 26, 1543 (1954)

14. BRAKKE, M.K.: Zonal separation by density-gradient centrifugation. Arch. Biochem. 45, 275 (1953)

15. BREMER, H. and M.W. KONRAD: A complex of enzymatically synthesized RNA and template DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 51, 801 (1964)

16. BRENNER, S., F. JACOB and M. MESELSON: An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. Nature 190, 576 (1961)

17. BUTENANDT, A. und P. KARLSON: Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormons der Insekten in kristallisierter Form. Z. Naturforsch. 9b, 389 (1954)

18. CARSTEN, M.E.: Actin. Its thiol groups. Biochemistry 5, 297 (1966)

19. CERIOTTI, G.: A microchemical determination of deoxyribonucleic acid. J. Biol. Chem. 198, 297 (1952)

20. CHRISTENSON, J.G., W. DAIRMANN and S. UDENFRIEND: Preparation and properties of a homogeneous aromatic L-amino acid decarboxylase from hog kidney. Arch. Biochem. Biophys. 141, 356 (1970)

21. CLEVER, U. und P. KARLSON: Induktion von Puff-Veränderungen in den Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus tentans durch Ecdyson. Exptl. Cell Res. 20, 623 (1960)

22. CONGOTE, L.F.: Beiträge zur Kenntnis der Wirkungsmechanismen der Hormone. Einfluß von Ecdyson und Juvenilhormon auf die Ribonukleinsäure-Synthese isolierter Fettkörper-Zellkerne aus Calliphora erythrocephala. Diss. Marburg 1970

23. CRICK, F.H.C.: On protein synthesis. Symp. Soc. exp. Biol. 12, 138 (1958)

24. DARNELL, J.E. jr.: Ribonucleic acids from animal cells. Bacteriolog. Rev. 32, 262 (1968)

25. DINGMANN, C.W. and A.C. PEACOCK: Analytical studies on nuclear ribonucleic acid using polyacrylamide gel electrophoresis. Biochemistry 7, 659 (1968)

26. DONALD, D., E. ZENSZOTEK and D.A. GOLDTHWAIT: Initiation by the DNS-dependent RNA polymerase. Biochemistry 56, 1026 (1966)

27. DOTY, P.: Inside nucleic acids. In: Harvey Lectures 55. p. 103. Academic Press, New York, 1961.

28. DOTY, P., J. MARMUR, J. EIGNER and C. SCHILDKRAUT: Strang separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: physical chemical studies. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 46, 461 (1960)

29. DREWS, J.: Nuclear RNA fractions and their relationship to polysomal RNA. Europ. J. Biochem. 2, 263 (1969)

30. DREWS, J. and G. BRAWERMAN: Alteration in the nature of ribonucleic acid synthesized in rat liver during regeneration and after cortisol administration. J. Biol. Chem. 242, 801 (1967)

31. DUKES, P.P., C.E. SEKERIS and W. SCHMID: On the mechanism of hormone action. VI. Increase in template activity of ribonucleic acid from isolated nuclei incubated in the presence of hormone. Biochim. Biophys. Acta 123, 126 (1966)

32. DUNN, D.B., J.D. SMITH and P.F. SPAHR: Nucleotide composition of soluble ribonucleic acid from Escherichia coli. J. Mol. Biol. 2, 113 (1960)

33. EDSTRÖM, J.E. and D. DANEHOLT: Sedimentation properties of the newly synthesized RNA from isolated nuclear components of Chironomus tentans salivary gland cells. J. Mol. Biol. 28, 331 (1967)

34. FESSLER, J.H. and A.J. BAILEY: The cleavage in vitro of the cross-links in gelatin by β-aminopropionitrile. Biochim. Biophys. Acta 117, 368 (1966)

35. FRAENKEL-CONRAT, H., B. SINGER and A. TSUGITA: Purification of viral RNA by means of bentonite. Virol. 14, 54 (1961)

36. FUCHS, E., R.L. MILETTE, W. ZILLIG and G. WALTER: Influence of salts on RNA synthesis by DNA-dependent RNA-polymerase from Escherichia coli. Europ. J. Biochem. 3, 183 (1967)

37. GEORGIEV, G.P.: On the structural organization of operon and the regulation of RNA synthesis in animal cells. J. theoret. Biol. 25, 473 (1969)

38. GEORGIEV, G.P. and M.J. LERMAN: Separation and some properties of distinct classes of newly-formed ribonucleic acid from animal cells. Biochim. Biophys. Acta 91, 678 (1964)

39. GEORGIEV, G.P and V.L. MANTIEVA: The isolation of DNA-like RNA and ribosomal RNA from the nucleolo-chromosomal apparatus of mammalian cells. Biochim. Biophys. Acta 61, 153 (1962)

40. GIANNITSIS, D., K. KESSELRING, W. SCHWARZHAUPT und G. SIEBERT: Ribonuclease-Aktivitäten in isolierten Rattenleber-Zellkernen. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 1133 (1967)

41. GILLESPIE, D. and S. SPIEGELMANN: A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membran. J. Mol. Biol. 12, 829 (1965)

42. GIRARD, M., H. LATHAM, S. PENMANN and J.E. DARNELL: Entrance of newly formed messenger RNA and ribosomes into HeLa cell cytoplasm. J. Mol. Biol. 11, 187 (1965)

43. GREEN, M.H.: Strand selective transcription of T4 DNA in vitro. Progr. Natl. Acad. Sci. U.S. 52, 1388 (1964)

44. GREENBERG, J.R.: Sedimentation studies on Drosophila virilis salivary gland RNA. J. Mol. Biol. 35, 49 (1967)

45. GROS, F., W. GILBERT, H.H. HIATT, G. ATTARDI, P.F. SPAHR and J.D. WATSON: Molecular and biological characterization of messenger RNA. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 26, 111 (1961)

46. GROSSBACH, V. and J.B. WEINSTEIN: Separation of ribonucleic acids by polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 22, 311 (1968)

47. HALL, B.D. and S. SPIEGELMANN: Sequence complementary of T2 DNA and T2 specific RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 47, 137 (1961)

48. HARBERS, E.: Die Nukleinsäuren. Eine einführende Darstellung ihrer Chemie, Biochemie und Funktionen. S. 62. G. Thieme Verlg., Stuttgart, 1964

49. HOLDER, J.W. and J.B. LINGREL: The localization of the hemoglobin messenger RNA on the 40s ribosomal subunit of rabbit reticulocyte polysomes. Biochim. Biophys. Acta 204, 210 (1970)

50. HOMOKI, J., J. LUKACS and C.E. SEKERIS: Effect of ammonium sulfate and other salts on the ribonuclease activity of isolated rat liver nuclei. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 1392 (1967)

51. HOPPE, W. und R. HUBER: Zur Chemie des Ecdysons II. Bestimmung des Sterin-Skeletts und seiner Orientierung mit diffuser Röntgenstreuung in Kristallen von Ecdyson. Chem. Ber. 98, 2353 (1965)

52. HUANG, R.C. and J. BONNER: Histone-bound RNA, a component of native nucleohistone. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 54, 960 (1965)

53. HUBER, R. und W. HOPPE: Zur Chemie des Ecdysons VII. Die Kristall- und Molekülstrukturanalyse des Insekten-verpuppungshormons Ecdyson mit der automatisierten Faltmolekülmethode. Chem. Ber. 98, 2403 (1965)

54. JACOB, F. and J. MONOD: Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol. 3, 318 (1961)

55. JONES, O.W., and P. BERG: Studies on the binding of RNA polymerase to polynucleotides. J. Mol. Biol. 22, 199 (1966)

56. KARLSON, P.: Biochemical studies on insect hormones. Vitamins Hormones 14, 227 (1956)

57. KARLSON, P.: Biochemische Wirkungsweise der Hormone. Deut. Med. Wochschr. 86, 668 (1961)

58. KARLSON, P.: New concepts on the mode of action of hormones. Perspect. Biol. Med. 6, 203 (1963)

59. KARLSON, P.: Chemie und Biochemie der Insektenhormone. Angew. Chem. 75, 257 (1963)

60. KARLSON, P.: Ecdyson, das Häutungshormon der Insekten. Naturwissenschaften 53, 445 (1966)

61. KARLSON, P., H. HOFFMEISTER, H. HUMMEL, P. HOCKS und G. SPITELLER: Zur Chemie des Ecdysons VI. Reaktionen des Ecdysonmoleküls. Chem. Ber. 98, 2394 (1965)

62. KARLSON, P. und C.E. SEKERIS: Zum Tyrosinstoffwechsel der Insekten IX. Kontrolle des Tyrosinstoffwechsels durch Ecdyson. Biochim. Biophys. Acta 63, 489 (1962)

63. KARLSON, P. and C.E. SEKERIS: Biochemical mechanisms of hormone action. Acta endocrinol. 53, 505 (1966)

64. KARLSON, P. and C.E. SEKERIS: Ecdyson, an insect steroid hormone, and its mode of action. Recent Progr. Hormone Res. 22, 473 (1966)

65. KARLSON, P., C.E. SEKERIS und K.E. SEKERI: Zum Tyrosinstoffwechsel der Insekten VI. Identifizierung von N-Acetyl-3,4-dihydroxy-β-phenäthylamin (N-Acetyldopamin) als Tyrosinmetabolit. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 327, 86 (1962)

66. KENNEY, F.T.: Induction of tyrosine-α-ketoglutarate transaminase in rat liver. J. Biol. Chem. 237, 1610 (1962)

67. KITAGAWA, S., W. DRABIKOWSKI and J. GERGELY: Exchange and release of the bound nucleotide of F-actin. Arch. Biochem. Biophys. 125, 706 (1968)

68. KROEGER, H.: Chemical nature of the system controlling gene activities in insect cells. Nature 200, 1234 (1963)

69. KURLAND, C.G.: Molecular characterization of ribonucleic acid from Escherichia coli ribosomes. I. Isolation and molecular weights. J. Mol. Biol. 2, 83 (1960)

70. LABRIE, F.: Isolation of an RNA with the properties of haemoglobin messenger. Nature 221, 1217 (1969)

71. LAMFROM, H. and E.R. GLOWACKI: Controlled dissociation of rabbit reticulocyte ribosomes and its effect on hemoglobin synthesis. J. Mol. Biol. 5, 97 (1962)

72. LANE, B.G.: The separation of adenosine, guanosine, cytidine and uridine by one-dimensional filter-paper chromatography. Biochim. Biophys. Acta 72, 110 (1963)

73. LANG, N., P. HERRLICH and C.E. SEKERIS: On the mechanism of hormone action. VII. Induction by cortisol of a messenger RNA coding for tyrosine-α-ketoglutarate transaminase in an in vitro system. Acta endocrinol. 57, 33 (1968)

74. LANG, N. und C.E. SEKERIS: Einfluß von Cortisol auf den RNS- und Proteinstoffwechsel in Rattenleber. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 338, 238 (1965)

75. LIAO, S., D. SAGHER, A.H. LIN and S. FANG: Magnesium and manganese specific forms of soluble liver RNA polymerase. Nature 223, 297 (1969)

76. LIAU, M.C., N.C. CRAIG and R.P. PERRY: The production of ribosomal RNA from high molecular weight precursors. I. Factors wich influence the ability of isolated nucleoli to process 45s RNA. Biochim. Biophys. Acta 169, 196 (1968)

77. LOENING, U.E.: The fractionation of high-molecular-weight ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis. Biochem. J. 102, 251 (1967)

78. LOENING, U.E.: Fractionation of RNA on polyacrylamide gels; scanning of gels in the ultraviolett. In: The Joyce-Loebl-Review (ed. by Joyce, Loebl & Co, Ltd.). Princesway, Team Valley, Gateshead, England, 1968.

79. LOWRY, O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Bio. Chem. 193, 265 (1951)

80. LUKACS, J. and C.E. SEKERIS: On the mechanism of hormone action. IX. Stimulation of RNA polymerase activity of rat liver nuclei by cortisol in vitro. Biochim. Biophys. Acta 134, 85 (1967)

81. MARTIN, R.G. and B.N. AMES: A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures. J. Biol. Chem. 236, 1372 (1961)

82. MAUL, G.G. and T.H. HAMILTON: The intranuclear localization of two DNA-dependent RNA polymerase activities. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 57, 1371 (1967)

83. MAURER, H.G.: Disk-Elektrophorese. S. 3. Verlg. Walter de Gruyter & Co, Berlin, 1968.

84. McPHIE, P., J. HONNSELL and W.B. GRATZER: The specific cleavage of yeast ribosomal ribonucleic acid with nucleases. Biochemistry 5, 989 (1966)

85. MESELSON, M., F.W. STAHL and J. VINOGRAD: Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients. Progr. Natl. Acad. Sci. U.S. 43, 581 (1957)

86. MONIER, R., S. NAONO, D. HAYES, F. HAYES and F. GROS: Studies on the heterogeneity of messenger RNA from E. coli. J. Mol. Biol. 5, 311 (1962)

87. MUNCK, A.: The effects of hormones at cellular level. In: Recent advances in endocrinology (ed. by V.H.T. James). p. 139. Churchill, London, 1968.

88. NIESSING, J. and C.E. SEKERIS: Fate of nuclear RNA. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 351, 777 (1970)

89. NYGAARD, A.P. and B.D. HALL: A method for the detection of RNA-DNA complexes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 12, 98 (1963)

90. OGUR, M. and G. ROSEN: The nucleic acids of plant tissues. I. The extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. Arch. Biochem. Biophys. 25, 262 (1949)

91. PEACOCK, A.C. and C.W. DINGMANN: Resolution of multiple ribonucleic acid species by polyacrylamide gel electrophoresis. Biochemistry 6, 1818 (1967)

92. PEACOCK, A.C. and C.W. DINGMANN: Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels. Biochemistry 7, 668 (1968)

93. PENE, J.J., E. KNIGHT jr. and J.E. DARNELL jr.: Characterization of a new low molecular weight RNA in HeLa cell ribosomes. J. Mol. Biol. 33, 609 (1968)

94. PENMAN, S., C. VESCO and M. PENMAN: Localization and kinetics of formation of nuclear heterodisperse RNA and polyribosome-associated messenger RNA in HeLa cells. J. Mol. Biol. 34, 49 (1968)

95. PERRY, R.P. and D.E. KELLEY:Buoyant densities of cytoplasmic ribonucleoprotein particles of mammalian cells: distinctive character of ribosome subunits and the rapidly labeled components. J. Mol. Biol. 16, 255 (1966)

96. PERRY, R.P. and D.E. KELLEY: Evidence for specific association of protein with newly formed ribosomal subunits. Biochem. Biophys. Res. Comm. 24, 459 (1966)

97. POGO, A.O., V.C. LITTAU, V.G. ALLFREY and A.E. MIRSKY: Modification of ribonucleic acid synthesis in nuclei isolated from normal and regenerating liver: some effects of salt and specific divalent cations. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 57, 743 (1967)

98. POSSOMPES, B.: Recherches expérimentales sur le determinisme de la metamorphose de Calliphora erythrocephala Meig. Arch. Zool. Exptl. et Gen. 89, 203 (1953)

99. POTTER, V.R. and C.A. ELVEHJEM: A modified method for the studie of tissue oxydation. J. Biol. Chem. 114, 495 (1936)

100. PRICE, G.M.: Protein synthesis and nucleic acid metabolism in the fat body of the larva of the blowfly Calliphora erythrocephala. J. Insect. Physiol. 15, 931 (1969)

101. PRYOR, M.G.M.: Sclerotization. In: Comparative Biochemistry (Ed. M. Florkin and H.S. Mason). p. 371. Academic Press, New York, 1963.

102. RICHARDSON, J.P.: The binding of RNA polymerase to DNA. J. Mol. Biol. 21, 83 (1966)

103. SAMARINA, O.P., E.M. LUKANIDIN and G.P. GEORGIEV: On the structural organization of the nuclear complexes containing messenger RNA. Biochim. Biophys. Acta 142, 561 (1967)

104. SCHERRER, K., H. LATHAM and J.E. DARNELL: Demonstration of an unstable RNA and of a precursor to ribosomal RNA in HeLa cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 49, 240 (1963)

105. SCHERRER, K., L. MARCAUD, F. ZAJDELA, J.M. LONDON, F. GROS: Patterns of RNA metabolism in a differentiated cell: a rapidly labeled, unstable 60s RNA with messenger properties in duck erythroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 56, 1571 (1966)

106. SCHILDKRAUT, C.L., J. MARMUR, J. FRESCO and P. DOTY: Formation and properties of ribonucleotide-polydeoxyribonucleotide helical complexes. J. Biol. Chem. 236, PC 4 (1961)

107. SCHILTZ, E. and C.E. SEKERIS: Enzymatic phosphorylation of nuclear proteins by (γ-^{32}P)ATP in isolated rat liver nuclei. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, 317 (1969)

108. SCHÜTZ, G., D. GALLWITZ and C.E. SEKERIS: Rapidly labeled high molecular RNA from rat liver. Europ. J. Biochem. 4, 149 (1968)

109. SEKERIS, C.E.: Sklerotization in the blowfly imago. Science 144, 419 (1964)

110. SEKERIS, C.E.: Zum Tyrosinstoffwechsel der Insekten XII. Reinigung, Eigenschaften und Substratspezifität der Dopa-Decarboxylase.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 332, 70 (1963)

111. SEKERIS, C.E.: Wirkung der Hormone auf den Zellkern.
In: Wirkungsmechanismen der Hormone. S. 126. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 1967.

112. SEKERIS, C.E.: Persönliche Mitteilung.

113. SEKERIS, C.E. und P. KARLSON: Zum Tyrosinstoffwechsel der Insekten VII. Der katabolische Abbau des Tyrosins und die Biogenese der Sklerotierungssubstanz, N-Acetyl-dopamin. Biochim. Biophys. Acta 62, 103 (1962)

114. SEKERIS, C.E. and P. KARLSON: On the mechanism of hormone action. II. Ecdyson and protein biosynthesis.
Arch. Biochem. Biophys. 105, 483 (1964)

115. SEKERIS, C.E. and N. LANG: Introduction of dopa-decarboxylase activity by insect-messenger RNA in an in vitro amino acid incorporating system from rat liver.
Life Sci. 3, 625 (1964)

116. SEKERIS, C.E. und N. LANG: Zur Protein-Biosynthese bei Insekten. Der in-vitro-Einbau von Aminosäuren in Protein durch Fraktionen aus Epidermiszellen der Schmeißfliege, Calliphora erythrocephala.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 342, 161 (1965)

117. SEKERIS, C.E., N. LANG und P. KARLSON: Zum Wirkungsmechanismus der Hormone V. Der Einfluß von Ecdyson auf den RNS-Stoffwechsel in der Epidermis der Schmeißfliege Calliphora erythrocephala.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 341, 36 (1965)

118. SEKERIS, C.E., W. SCHMID und D. GALLWITZ: Nicht publizierte Ergebnisse.

119. SHAAYA, E. und P. KARLSON: Der Ecdysontiter während der Insektenentwicklung II. Die postembryonale Entwicklung der Schmeißfliege Calliphora erythrocephala Meig.
J. Insect. Physiol. 11, 65 (1965)

120. SHAAYA, E. and C.E. SEKERIS: Ecdyson during insect development III. Activities of some enzymes of tyrosine metabolism in comparison with ecdysontiter during the development of the blowfly, Calliphora erythrocephala Meig. Gen. Comp. Endocr. 5, 35 (1965)

121. SPAHR, P.F. and A. TISSIERES: Nucleotide composition of ribonucleoprotein particles from Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 1, 237 (1959)

122. SPIEGELMANN, S., B.D. HALL and R. STORCK: The occurence of natural DNA-RNA complexes in Escherichia coli infected with T2.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 47, 1135 (1961)

123. SPIRIN, A.S.: The second Sir Hans Krebs lecture. Informosomes. Europ. J. Biochem. 10, 20 (1969)

124. SPIRIN, A.S. and M. NEMER: Messenger RNA in early sea-urchin embryos: cytoplasmic particles.
Science 150, 214 (1965)

125. SPOHR, G., N. GRANBOULAN, C. MOREL and K. SCHERRER: Messenger RNA in HeLa cells: an investigation of free and polyribosome-bound cytoplasmic messenger ribonucleoprotein particles by kinetic labelling and electron microscopy. Europ. J. Biochem. 17, 296 (1970)

126. SUTHERLAND, E.W., R.W. BUTCHER, G.A. ROBISON and J.G. HARDMAN: The role of adenosine 3',5'-monophosphate in hormone action. In: Wirkungsmechanismen der Hormone. S. 1. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 1967.

127. TAKAHASHI, S.: Studies on ribonucleic acid in the fat body of Philosamia cynthia ricini Donovan (Lepidoptera) during development. J. Insect Physiol. 12, 789 (1966)

128. TATA, J.R.: Hormones and the synthesis and utilization of ribonucleic acids. Progr. Nucl. Acid Res. and Molec. Biol. 5, 191 (1966)

129. TISCHLER, P.v. and C.J. EPSTEIN: A convient method of preparing polyacrylamide gels for liquid scintillation spectrometry. Anal. Biochem. 22, 89 (1968)

130. TISSIERES, A., J.D. WATSON, D. SCHLESINGER and B.R. HOLLINGWORTH: Ribonucleoprotein particles from Escherichia coli. J. Mol. Biol. 1, 221 (1959)

131. TOMKINS, G.M. and E.S. MAXWELL: Some aspects of steroid hormone action. A. Rev. Biochem. 32, 677 (1963)

132. VOLKIN, E. and L. ASTRACHAN: Phosphorus incorporation in Escherichia coli ribonucleic acid after infection with bacteriophage T2. Virology 2, 146 (1956)

133. WARNER, J.R.: The assembly of ribosomes in HeLa cells. J. Mol. Biol. 19, 383 (1966)

134. WARNER, J.R., R. SOEIRO, H.C. BIRNBOIM, M. GIRARD and J.E. DARNELL: Rapidly labeled HeLa cell nuclear RNA I. Identification by zone sedimentation of a heterogeneous fraction separate from ribosomal precursor RNA.
J. Mol. Biol. 19, 349 (1966)

135. WATSON, J.D.: Die Beteiligung der Ribonukleinsäure an der Proteinsynthese. Angew. Chem. 75, 439 (1963)

136. WEINBERG, R.A. and S. PENMAN: Small molecular weight monodisperse nuclear RNA. J. Mol. Biol. 38, 289 (1968)

137. WEST, J.J., B. NAGY and J. GERGELY: Free adenosine diphosphate as an intermediary in the phosphorylation by creatine phosphate of adenosine diphosphate bound to actin. J. Biol. Chem. 242, 1140 (1967)

138. WEST, J.J., B. NAGY and J. GERGELY: The effect of EDTA on spectral properties of ATP-, ADP- and ITP-G-actin. Biochem. Biophys. Res. Comm. 29, 611 (1967)

139. WIGGLESWORTH, V.B.: The action of growth hormones in insects. Symp. Soc. exp. Biol. 11, 204 (1957)

140. WYATT, G.: The quantitative composition of deoxypentose nucleic acids. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 18, 133 (1953)

141. YOSHIKAWA, M., T. FUKADA and Y. KAWADE: Separation of rapidly labeled RNA of animal cells into DNA-type and ribosomal RNA-type components. Biochem. Biophys. Res. Comm. 15, 23 (1964)

142. YOSHIKAWA-FUKADA, M., T. FUKADA and Y. KAWADE: Characterization of rapidly labeled ribonucleic acid of animal cells in culture. Biochim. Biophys. Acta 103, 383 (1965)

143. ZAMENHOF, S., G. BRAWERMAN and E. CHARGAFF: On the desoxypentose nucleic acids from several microorganisms. Biochim. Biophys. Acta 9, 402 (1952)

144. ZILLIG, W., E. FUCHS, R.L. MILLETTE, G. WALTER, P. PALM and H. PRIESS: A model for the regulation of transcription. In: Biochemistry of ribosomes and messenger-RNA. (Hrsg. R. Lindigkeit, P. Langen, J. Richter). Akademie Verlag, Berlin, 1968.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 1969 bis Mai 1971 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. P. KARLSON im Institut für Physiologische Chemie der Philipps-Universität Marburg.

Herrn Professor KARLSON möchte ich für sein Interesse und seine großzügige Förderung beim Entstehen der Arbeit sehr herzlich danken.

Herrn Professor Dr. C.E. SEKERIS bin ich besonders dankbar für die umfassende Einführung in die Problemstellung und Methodik und für zahlreiche wertvolle Ratschläge und Diskussionen, die für den Verlauf der Arbeit entscheidend waren.

Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises SEKERIS danke ich dafür, daß sie sich stets freundlich und hilfsbereit zeigten.

Lebenslauf

Am 25. November 1944 wurde ich als Sohn des Rolf Osang und seiner Ehefrau Eva-Margarethe, geb. Haering, in Brieg, Schlesien, geboren. Ich besuchte von 1951 bis 1956 die Grundschule in Philippsburg und Reichenbach/Baden, von 1956 bis 1958 das Gymnasium in Bruchsal/Baden, von 1958 bis 1960 das Gymnasium in Ettlingen/Baden und von 1960 bis 1964 das Mathematisch-Naturwissenschaftliche Gymnasium in Neuenbürg/Württemberg, wo ich im Februar 1964 die Reifeprüfung ablegte. Unmittelbar nach der Reifeprüfung wurde ich zu einem Grundwehrdienst von 12 Monaten zur Bundeswehr eingezogen. Mit dem Sommersemester 1965 begann ich das Studium der Medizin an der Philipps-Universität Marburg. Das Wintersemester 1968/69 verbrachte ich an der Universität Wien, kehrte danach wieder nach Marburg zurück und legte dort am 16. Januar 1971 die ärztliche Prüfung ab.

Im Wintersemester 1969/70 begann ich mit der Arbeit für meine Dissertation am Physiologisch-Chemischen Institut der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. P.Karlson. Nach der Unterbrechung durch die ärztliche Prüfung beendete ich sie im Mai 1971.

Als Medizinalassistent arbeitete ich bisher am Physiologisch-Chemischen Institut der Philipps-Universität Marburg, an der II. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses Moabit, Berlin, und an der Chirurgischen Abteilung des Städtischen Behring-Krankenhauses, Berlin. Zur Zeit bin ich am Institut für Pathologie am Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin als Medizinalassistent beschäftigt.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

an der Philipps-Universität Marburg:

Berendes, Buchholz, Dimroth, Du Mesnil, Exner, Gedigk, Hensel, Henssen, Heuser, Jacob, Kamke, Karlson, Linneweh, Martini, Petry, Rohen, Rodeck, Schirren, Schleyer, Schmid, Schwaiger, Seidel, Siegert, Stosch, Straub, Walcher, Zilliken.

an der Universität Wien:

Chiari, Fellinger, Fuchsig, Hoff, Husslein.